

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI**

**FEDERICO II**

DOTTORATO DI RICERCA IN  
*GENETICA E MEDICINA MOLECOLARE*  
XVIII CICLO



**IDENTIFICAZIONE DI NUOVE PROTEINE COINVOLTE NELLA  
REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA TIROIDE-SPECIFICA**

**Coordinatore:**

Ch.mo Prof.

Carmelo Bruno Bruni

**Candidato:**

Dott. Roberto Nitsch

**DOCENTE GUIDA:**

Dott.ssa Stella Zannini

**ANNO ACCADEMICO 2005-2006**

*Potrei dedicare questa tesi a molte persone, persino a molte cose.  
Potrei dedicarla al mio capo, ai miei colleghi, agli amici e parenti  
che mi sono stati vicini. Potrei dedicarla a “mammà e papà”, oppure  
ai nipoti, a mia moglie o a chiunque altro. Invece la dedico a te  
LETTORE.*

*Te la dedico sperando tu capisca che nella vita c'è sempre un piano B.*

*Non è andata come speravo...  
è andata molto meglio.*

# INDICE

## **INTRODUZIONE**

<i>La regolazione della trascrizione tessuto-specifica nel differenziamento cellulare.</i>	<i>pag. 3</i>
<i>I complessi proteici e la trascrizione regolata.</i>	<i>pag. 6</i>
<i>La cellula tiroidea differenziata: fattori trascrizionali tessuto-specifici e regolazione dell'espressione dei geni marcatori del differenziamento.</i>	<i>pag. 9</i>

## **SCOPO DEL PROGETTO**

*pag. 17*

## **RISULTATI**

<i>Analisi del complesso proteico contenente Pax8 mediante cromatografia ad esclusione molecolare.</i>	<i>pag. 19</i>
<i>Purificazione del complesso nativo di Pax8.</i>	<i>pag. 20</i>
<i>Il sistema 3XFLAG®.</i>	<i>pag. 21</i>
<i>L'alternativa: il sistema TAP.</i>	<i>pag. 26</i>
<i>L'evoluzione del sistema TAP: il FLAP.</i>	<i>pag. 31</i>
<i>L'ultima risorsa: il sistema del GST.</i>	<i>pag. 34</i>
<i>Pax8 e PARP-1 interagiscono in vitro ed in vivo.</i>	<i>pag. 37</i>
<i>Modifiche per migliorare il sistema GST pull-down.</i>	<i>pag. 38</i>

## **MATERIALI E METODI**

<i>Plasmidi</i>	<i>pag. 47</i>
<i>Culture cellulari e trasfezioni.</i>	<i>pag. 48</i>
<i>Estratti cellulari.</i>	<i>pag. 48</i>
<i>Preparazione della proteina ricombinante.</i>	<i>pag. 49</i>
<i>Saggio di GST pull-down.</i>	<i>pag. 50</i>
<i>Immunoprecipitazione.</i>	<i>pag. 50</i>
<i>Purificazione per affinità del complesso FLAG.</i>	<i>pag. 51</i>
<i>Purificazione del complesso mediante TAP.</i>	<i>pag. 51</i>
<i>Purificazione del complesso mediante FLAP.</i>	<i>pag. 51</i>
<i>Analisi cromatografica di Pax8 e TTF-1.</i>	<i>pag. 52</i>
<i>Anticorpi, Immunoblot e colorazione al nitrato d'argento.</i>	<i>pag. 52</i>
<i>Oligonucleotidi.</i>	<i>pag. 53</i>

## **DISCUSSIONE**

*pag. 54*

## **BIBLIOGRAFIA**

*pag. 47*

## **PUBBLICAZIONI**

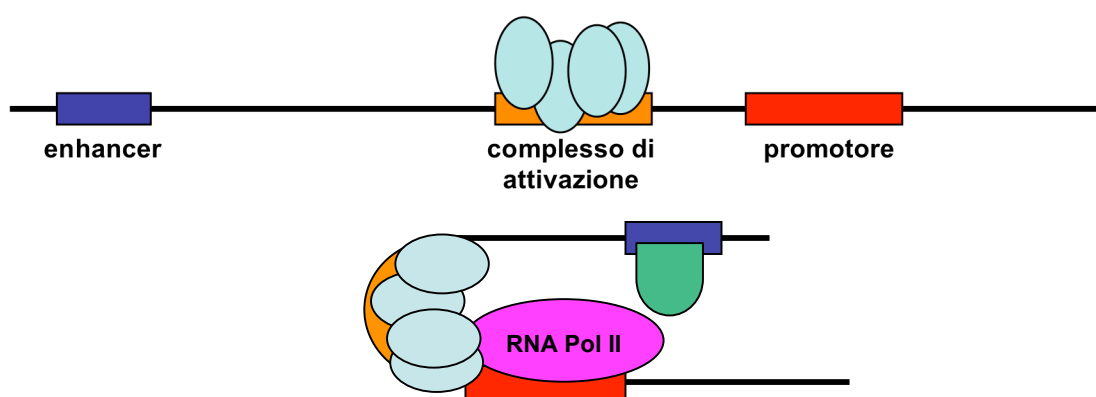
*pag. 61*

## INTRODUZIONE

### **La regolazione della trascrizione tessuto-specifica nel differenziamento cellulare.**

Il controllo trascrizionale è la principale modalità di regolazione dell'espressione genica negli eucarioti così come nei batteri. Esso contribuisce a delineare l'insieme delle proteine espresse da una cellula e, più in generale, le funzioni caratteristiche di una cellula. Ciò consente, in particolare negli organismi pluricellulari, che geni appropriati siano espressi nelle cellule appropriate nel corso della crescita, dello sviluppo e del differenziamento cellulare.

Negli eucarioti l'espressione genica è regolata da molteplici regioni di controllo, costituite da sequenze in *cis* presenti sul complesso promotore-*enhancer* del DNA genomico (Figura 1). Alcuni elementi di controllo sono localizzati vicino al sito d'inizio della trascrizione mentre altri sono molto distanti; entrambi gli elementi possono generalmente stimolare o inibire la trascrizione anche se posizionati invertiti. Le sequenze in *cis* esplicano la loro funzione mediante il legame con proteine che riconoscono tali sequenze, ne codificano l'informazione genetica regolatoria e trasmettono l'appropriata risposta alla RNA polimerasi II e al macchinario trascrizionale. Tali proteine sono conosciute con il nome di fattori di trascrizione.



**Figura 1:** Struttura genica del complesso promotore/enhancer. In figura sono rappresentati gli elementi di controllo prossimale su cui si legano i fattori trascrizionali (complesso di attivazione e gli elementi di controllo distale (enhancer).

I fattori trascrizionali sono costituiti da una struttura modulare che oltre al dominio di legame al DNA presenta uno o più domini d'attivazione (o repressione) coinvolti nell'interazione con il complesso trascrizionale. I domini d'interazione con il DNA sono stati i primi ad essere identificati ed hanno portato alla classificazione dei fattori

di trascrizione in varie famiglie, a seconda del dominio di legame al DNA posseduto (Pabo and Sauer, 1992). Residui amminoacidici differenti presenti su fattori trascrizionali appartenenti alla stessa famiglia permettono il legame specifico a sequenze nucleotidiche differenti. Ad esempio, i diversi membri della famiglia dei fattori trascrizionali Pax, pur condividendo un dominio omologo di legame al DNA, il *paired domain*, legano diverse sequenze nei siti promotore-*enhancer*.

La struttura degli elementi regolatori in *cis* non è semplicemente un insieme di siti di riconoscimento per fattori trascrizionali che agiscono in maniera additiva nel determinare l'attività trascrizionale dei geni regolati. Oggi, infatti, si considera la funzione dei fattori di trascrizione secondo un modello d'azione cooperativa e sinergica (Kornberg et al., 1999). I fattori di trascrizione non vanno visti come singole unità monomeriche ma come elementi di complessi multiproteici che regolano l'attività trascrizionale in maniera combinata, ossia più proteine regolano un solo gene in modo da integrare molti e differenti segnali cellulari (Wolberger, 1998). Nella formazione di tali complessi multiproteici la funzione principale è svolta dal dominio di trans-attivazione dei fattori di trascrizione. Esso rende il fattore di trascrizione capace di funzionare in maniera attivatoria o inibitoria interagendo col complesso trascrizionale. La presenza dei soli fattori di trascrizione e dell'apparato trascrizionale basale non è sempre sufficiente ad attivare la trascrizione, nemmeno *in vitro*. Negli ultimi anni è venuto delineandosi un nuovo modello di regolazione trascrizionale, in cui i protagonisti principali sono sempre i fattori di trascrizione, ma la loro azione è mediata da proteine accessorie dette co-attivatori. I co-attivatori possono regolare l'attività trascrizionale della RNA polimerasi II sia direttamente che indirettamente mediante interazioni proteina-proteina (Ptashne and Gann, 1997). A seconda della loro attività sono stati raggruppati in tre classi. Una prima classe comprende co-fattori dotati di attività catalitica, i quali sono capaci di modificare la struttura nucleosomica e di permettere ai fattori di trascrizione l'accesso alle sequenze regolatorie. Un esempio è offerto dal fattore p300/CBP dotato di attività acetil-transferasica e capace d'interagire con vari fattori trascrizionali e con altre proteine (Hermanson et al., 2002). Una seconda classe comprende membri del complesso TRAP/DRIP/Mediator/ARC, che servono da ponte tra i fattori di trascrizione e il macchinario trascrizionale basale (Malik and Roeder, 2000). L'ultima classe include co-regolatori che indirettamente influenzano l'attività trascrizionale, modificando i nucleosomi o modificando covalentemente gli istoni: un esempio è offerto dal complesso SWI/SNF di lievito e dal suo omologo nei mammiferi BRG1 o BRM (Spiegelman and Heinrich, 2004).

La regolazione della trascrizione è quindi stabilita da un complesso multiproteico chiamato *enhanceosoma* (Merika and Thanos, 2001). Esemplificativo è in tal senso il modello di *enhanceosoma* che si forma a monte del gene  $INF\beta$  dopo induzione virale (Thanos and Maniatis, 1995). In tale sistema sono coinvolte proteine architetturali come HMGI(Y), fattori di trascrizione (Jun, ATF-2, NF-kB) e coattivatori (CBP) che interagiscono con il complesso di trascrizione e con il templatato cromatinico. I fattori di trascrizione rappresentano i piloni di una struttura caratterizzata da molecole accessorie che fanno da ponte tra la struttura cromatinica aperta e il complesso di trascrizione basale. I co-regolatori agiscono nell'ambito di complessi multiproteici la cui combinazione, e quindi eterogeneità determina l'identità cellulare. La combinazione di fattori e co-fattori tessuto-specifica e/o ubiquitaria, le modificazioni post-traduzionali a carico di entrambi e la presenza di numerose sequenze *cis*-regolatorie a monte dei geni in un dato tipo cellulare conferiscono un controllo spaziale e temporale sull'espressione genica.

Riassumendo, nel corso del differenziamento cellulare, ed in risposta ad ormoni e segnali provenienti da cellule vicine, vengono assemblati diversi complessi multiproteici che regolano direttamente l'assemblaggio dei complessi d'inizio della trascrizione sui promotori di geni *target* e la frequenza con cui la trascrizione stessa inizia. Alla base del differenziamento cellulare c'è quindi la differente combinazione di proteine specificamente espresse in ciascun tipo cellulare.

### **I complessi proteici e la trascrizione regolata.**

L'interazione proteina-proteina è uno degli eventi fondamentali nella regolazione dell'espressione genica. I fattori di trascrizione (attivatori) sono sempre stati i protagonisti della modulazione del meccanismo trascrizionale. Alcuni attivatori sono in grado di mettere in moto la macchina trascrizionale per interazione diretta sui promotori. Negli ultimi anni è venuto delineandosi un nuovo modello di interazione mediata da proteine accessorie: i mediatori. I mediatori sono proteine che intervengono nel contatto diretto dei fattori di trascrizione sia con il promotore che con il complesso della RNA polimerasi. I mediatori rivestono un ruolo chiave nell'ambito della trascrizione, tale funzione ha fatto sì che suddetti mediatori venissero chiamati coattivatori trascrizionali. I coattivatori non agiscono da soli ma nell'ambito di complessi multiproteici costituiti da diverse unità; la combinazione, e quindi l'eterogeneità del complesso, può dipendere dalle interazioni createsi tra i

vari componenti del complesso stesso. I coattivatori non sono sempre selettivamente espressi in differenti tipi cellulari; è piuttosto la combinazione dei coattivatori che risulta selettiva non solo per tipo cellulare, ma anche per complesso trascrizionale. Quindi, uno stesso coattivatore può appartenere a diversi complessi ed interagire con più tipi di fattori di trascrizione, anche all'interno dello stesso tipo cellulare.

I primi coattivatori sono stati scoperti in lievito, isolati da un complesso di 20 subunità con saggi di interazione a sequenze specifiche (Kornberg, 1999). Prima della loro scoperta alcuni coattivatori erano stati studiati separatamente come fattori, la cui alterazione provocava difetti nel controllo della trascrizione in lievito; altri erano stati isolati come proteine interagenti con fattori di trascrizione. Determinati coattivatori possiedono attività catalitica; tutti stimolano la trascrizione genica più o meno selettivamente ed in maniera più o meno determinante. Alcune proteine di lievito chiamate TAFs (TBP-associated factors) sono stati tra i primi coattivatori ad essere caratterizzati. Gli omologhi umani (il complesso SMCC) sono stati rapidamente identificati e caratterizzati attraverso esperimenti *in vitro* (Wu and Hampsey, 1999). Altri esperimenti recenti mettono chiaramente in evidenza lo stretto rapporto che intercorre tra i livelli di espressione di coattivatori ed i livelli di attivazione trascrizionale di alcuni geni (Fry and Farnham, 1999).

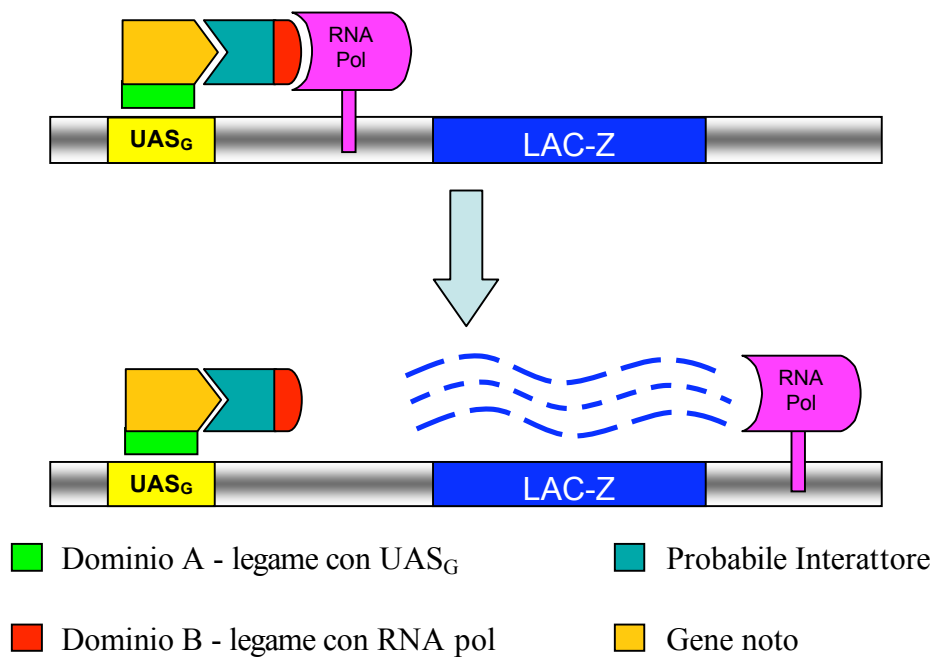
L'identificazione dei coattivatori è di fondamentale importanza per comprendere il funzionamento di un complesso multiproteico che regola la trascrizione.

L'interazione proteina-proteina è chiaramente alla base del processo di formazione del complesso multiproteico. Tale interazione rappresenta la chiave di volta per l'identificazione di nuovi membri del complesso. È indispensabile studiare l'interazione proteina-proteina per poter poi sfruttare tali studi nel migliorare le metodiche di identificazione dei complessi multiproteici. È necessario stabilire prima di tutto quale delle metodiche più si addice al caso in questione, e nel fare questo è molto importante essere in grado di studiare le interazioni in condizioni sperimentali che assomiglino il più possibile a quelle fisiologiche.

I metodi più comuni per isolare ed identificare coattivatori trascrizionali sono tre: *in vivo* esiste il sistema del doppio ibrido effettuato in lievito e lo screening immunologico in batteri; *in vitro*, la purificazione per cromatografia di affinità seguita da spettrometria di massa.

Il sistema del doppio ibrido è un saggio genetico per valutare le interazioni proteina-proteina che si basa sulla buona conoscenza della macchina trascrizionale del lievito. GAL4 è un fattore trascrizionale noto di lievito contenente due domini funzionali: il dominio A per il riconoscimento specifico della sequenza UAS<sub>G</sub> del promotore

(Upstream Activating Sequence by GAL1), il dominio B per l'interazione e l'attivazione del complesso della RNA polimerasi. Nel saggio la sequenza UAS<sub>G</sub> è a monte del gene LacZ che codifica per la proteina β-galattosidasi. L'esperimento procede con la fusione del dominio A con un gene noto e con la fusione del dominio B con una serie di sequenze codificanti per probabili interattori. Dopo la cotrasformazione del lievito, l'eventuale interazione attiverà il complesso della RNA polimerasi con produzione della proteina β-galattosidasi, la quale in presenza del substrato X-gal nella piastra colorerà di blu le colonie (Figura 2).

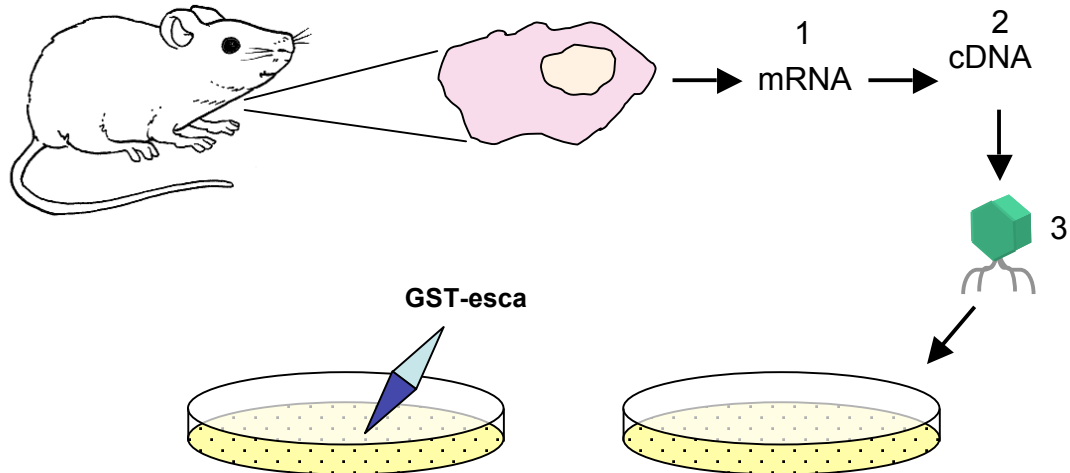


**Figura 2:** Funzionamento schematico del doppio ibrido. L'interattore, legandosi al gene noto, attiva la trascrizione del gene Lac-Z con conseguente colorazione delle colonie.

Lo screening immunologico si basa sulla possibilità di isolare dei cloni all'interno di una vasta libreria di espressione, grazie alle interazioni proteina-proteina. In questo sistema, la proteina *esca* (la proteina di cui si vogliono identificare possibili interattori) viene subclonata in un vettore di espressione in modo da generare una fusione con la proteina GST. Quindi, la proteina GST-*esca* viene utilizzata come sonda per effettuare uno *screening* di una libreria di espressione preparata a partire dal mRNA del tipo cellulare da cui si desidera isolare potenziali interattori. Mediante l'uso dell'anticorpo che riconosce la proteina GST è poi possibile identificare i cloni della libreria che sono stati in grado di effettuare un'interazione proteina-proteina con la sonda GST-*esca* (Figura 3). Una volta isolato, il clone positivo si procede alla purificazione del cDNA per poi identificare e caratterizzare la sequenza. Il limite principale di questa tecnica consiste nel fatto che il sistema batterico non permette



alle proteine di formare una struttura terziaria spesso necessaria per le interazioni proteina-proteina, quindi non tutti gli interattori possono essere identificati.



**Figura 3:** Schema di un processo di screening di una libreria di espressione fagica. Da cellule isolate da tessuto viene (1) estratto il mRNA, (2) preparato il cDNA che viene poi inserito (3) in un vettore fagico. Con tale vettore vengono infettate le cellule batteriche su cui si effettua lo *screening* mediante una proteina di fusione GST.

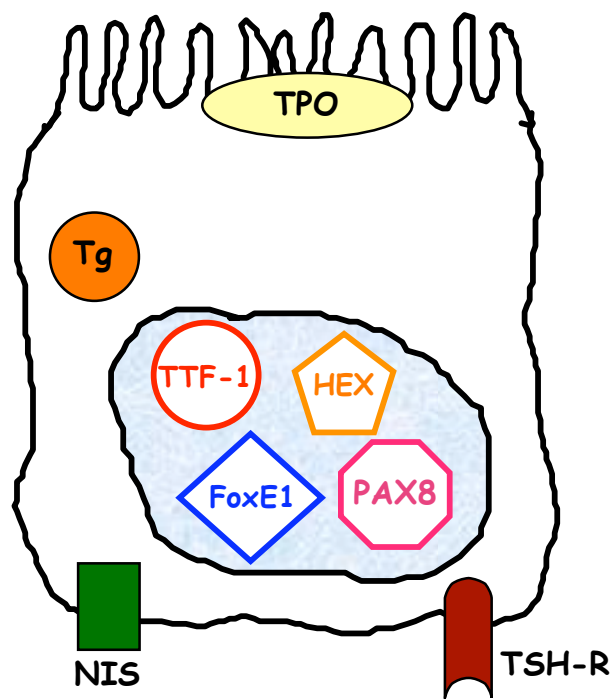
La spettrometria di massa, preceduta da cromatografia di affinità, è diventata una delle tecniche più diffuse al giorno d'oggi. È ormai un punto condiviso dalla comunità scientifica l'osservazione che legami proteici non covalenti possono essere analizzati con questa tecnica (Loo, 1997; Rostom and Robinson, 1999). Studi recenti hanno dimostrato che la spettrometria di massa fornisce informazioni non solo sulla stechiometria delle subunità di un complesso proteico (van Berkel et al., 2000; Zhang et al., 2000), ma anche sulle interazioni tra proteine che sono presenti in un complesso macromolecolare (Rostom et al., 2000). Uno degli aspetti positivi della spettrometria di massa, e forse il più attraente, è l'uso di quantità molto ridotte di proteina.

### **La cellula tiroidea differenziata: fattori trascrizionali tessuto-specifici e regolazione dell'espressione dei geni marcatori del differenziamento.**

La ghiandola tiroidea è costituita da cellule derivanti da tutti e tre i foglietti embrionali. Le cellule follicolari tiroidee, le sole di derivazione endodermica, sono adibite alla sintesi ed al rilascio regolato degli ormoni T3 e T4. La presenza di un adeguato substrato proteico e l'organizzazione follicolare permettono la sintesi degli ormoni tiroidei. L'ormone TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*), prodotto dall'ipofisi

anteriore, regola sia la proliferazione delle cellule follicolari tiroidee sia le diverse fasi della sintesi e della secrezione degli ormoni tiroidei. Il TSH stimola il rilascio di ormone tiroideo, mentre un meccanismo a *feedback* negativo regola la produzione di TSH in base alla concentrazione di ormone tiroideo presente nel sangue.

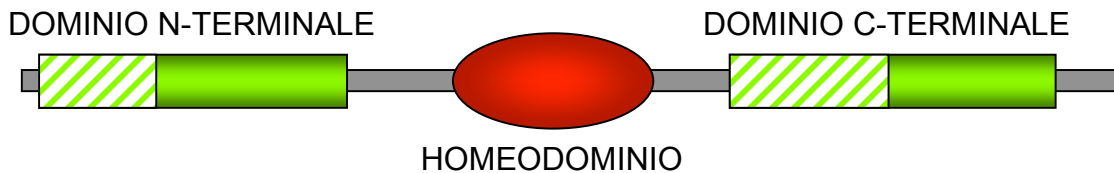
Le cellule follicolari sono altamente polarizzate e formano i follicoli tiroidei, strutture sferiche adibite alla conservazione e al rilascio controllato degli ormoni tiroidei (Mauchamp et al., 1998). Nella regione apicale della membrana cellulare è presente la tireoperossidasi (TPO), mentre il recettore del TSH (TSHr) e la pompa dello iodio (NIS) sono localizzati nella membrana basolaterale (Figura 4). Nel lume del follicolo vi è la tireoglobulina (Tg), una complessa molecola glicoproteica, che serve come matrice per la formazione degli ormoni tiroidei e come “banca” di deposito degli stessi. L’espressione genica di tutte queste proteine garantisce il caratteristico fenotipo della cellula tiroidea differenziata (Damante and Di Lauro, 1994; Damante et al., 2001).



**Figura 4:** Rappresentazione schematica di una cellula follicolare tiroidea in cui è possibile notare la polarità delle molecole.

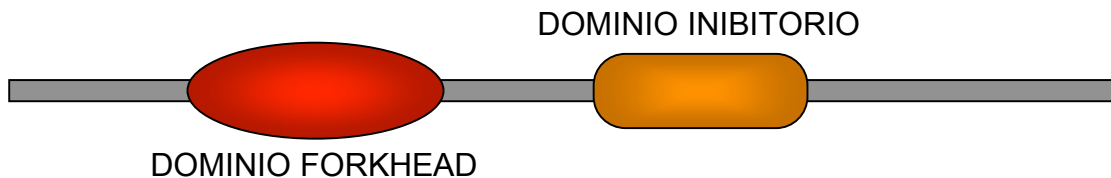
Fino ad oggi sono stati identificati in tiroide tre fattori indispensabili per l’espressione genica tessuto-specifica e sono: TTF-1 (*Thyroid Transcription Factor-1*), TTF-2/Foxe1 e Pax8 (*paired box gene 8*) (Damante et al., 2001; Pellizzari et al., 2000). TTF-1 è una proteina di 372 aminoacidi, il cui dominio di legame al DNA è rappresentato da un omeodominio (Civitareale et al., 1989; Guazzi et al., 1990) (Figura 5). La sua espressione nel topo e nell’uomo è limitata al polmone ed alla

tiroide, mentre è estesa anche al diencefalo e al telencefalo durante lo sviluppo embrionale (Guazzi et al., 1990; Lazzaro et al., 1991). La nomenclatura di questa proteina è stata più volte modificata; infatti è anche detta Nkx2-1 dal momento che appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione Nkx2 (Price et al., 1992).



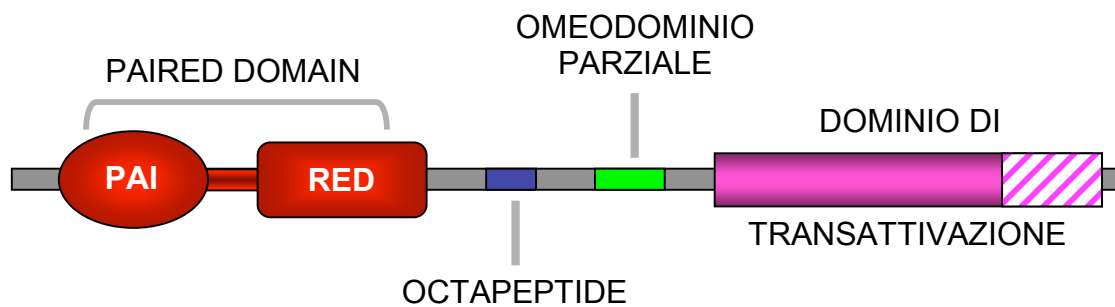
**Figura 5:** struttura schematica della proteina TTF-1

TTF-2 appartiene alla famiglia di proteine contenenti il dominio *helix/forkhead*, per cui il suo nome ufficiale oggi è Foxe1 (Figura 6). Durante lo sviluppo embrionale del topo, Foxe1 è espresso in tiroide e nell'ectoderma intestinale e cranio-faringeo. Nell'adulto l'espressione di Foxe1 persiste nelle cellule follicolari tiroidee. La generazione di topi *knock-out* per Foxe1 (De Felice et al., 1998) ha permesso di far luce sul ruolo di questo fattore nello sviluppo della ghiandola tiroidea. I topi *Foxe1*<sup>-/-</sup> muoiono alla nascita: essi sono affetti da palatoschisi e da un quadro di ipotiroidismo neonatale simile a quello mostrato nella disgenesia tiroidea umana.



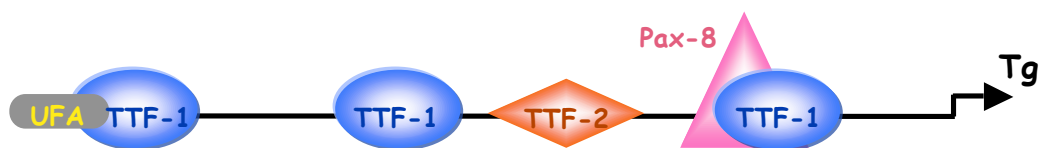
**Figura 6:** struttura schematica della proteina FoxE1

Pax8 è il terzo fattore tiroide-specifico noto. Come per gli altri due fattori di trascrizione appena descritti, la sua espressione in tiroide non è esclusiva essendo esso espresso anche nel rene e, durante la vita embrionale, in alcune aree del sistema nervoso centrale (Plachov et al., 1990). Le proteine della famiglia dei geni *Pax*, di cui fanno parte nove geni, sono caratterizzate dal *paired domain*, un dominio di 128 amminoacidi localizzato nella regione N-terminale che permette il legame al DNA (Gruss and Walther, 1992) (Figura 7). Questo dominio, identificato originariamente in *Drosophila*, è caratterizzato da due subdomini strutturalmente indipendenti: il subdominio PAI ed il subdominio RED, ognuno dei quali contiene un motivo *helix-turn-helix*. La presenza di due subdomini indipendenti rende ogni proteina Pax capace di riconoscere un'ampia gamma di sequenze di DNA e di legare tali sequenze mediante tipologie di legame diverse da proteina a proteina.



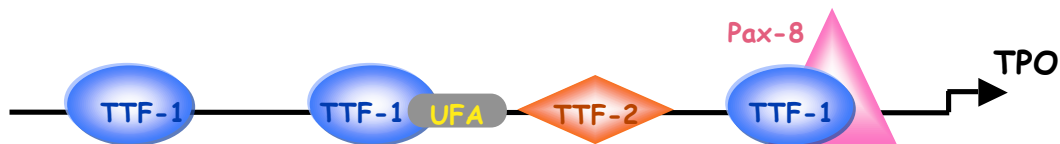
**Figura 6:** struttura schematica della proteina FoxE1

Dei marcatori tiroidei *Tg*, *TPO*, *NIS* e *TSHr* è stata caratterizzata la regione del promotore ed è noto almeno in parte il meccanismo preposto alla loro trascrizione specifica in cellule tiroidee. La regione del promotore che permette la trascrizione tiroide-specifica del gene della tireoglobulina (*Tg*) è situata tra le basi -170 e +1 rispetto al sito d'inizio della trascrizione (Damante and Di Lauro, 1994; Sinclair et al., 1990). Fattori di trascrizione, sia ubiquitari che tessuto-specifici, riconoscono siti di legame in questa regione (Figura 8). Nel promotore del gene *Tg* sono presenti tre siti di legame per il fattore di trascrizione TTF-1 (Civitareale et al., 1989; Guazzi et al., 1990), i quali si trovano in tre regioni denominate A, B e C. La regione C e la regione A sono essenziali per l'attività del promotore. Il sito di legame di Pax8 si sovrappone al sito di legame di TTF-1 nella regione C (Zannini et al., 1992), mentre nella regione A il sito di legame di un fattore di trascrizione ubiquitario (UFA, *ubiquitous factor A*) si sovrappone a quello di TTF-1. Meno rilevante è la funzione della regione B (Sinclair et al., 1990). La regione K, posta tra le regioni B e C, presenta il sito di legame per il fattore di trascrizione tiroideo Foxe1 (Zannini et al., 1997).



**Figura 8:** Rappresentazione schematica del promotore della Tireoglobulina

L'organizzazione del promotore del gene della tireoperossidasi (*TPO*) è molto simile a quella del promotore del gene *Tg* (Figura 9). Esso presenta tre siti di legame per TTF-1 nelle regioni A, B e C. Nella regione C il sito di legame di Pax8 si sovrappone a quello di TTF-1 mentre nella regione B il sito di legame di un fattore di trascrizione ubiquitario (UFB, *ubiquitous factor B*) si sovrappone a quello di TTF-1. Il sito di legame di Foxe1 è situato nella regione Z posta tra le regioni B e C (Francis-Lang et al., 1992).



**Figura 9:** Rappresentazione schematica del promotore della Tireoperossidasi

È interessante notare l'omologia dei promotori dei geni *Tg* e *TPO*, geni non correlati tra loro se non per l'espressione tiroide-specifica. Tale organizzazione, ed in particolare la sovrapposizione dei siti di legame di Pax8 e TTF-1, è ben conservata anche nelle diverse specie studiate. Questa evidenza è stata alla base di uno studio approfondito sul ruolo che i fattori trascrizionali TTF-1 e Pax8 giocano sul promotore di *Tg*. Esperimenti di transattivazione in cellule HeLa ed in cellule tiroidee differenziate PC, hanno dimostrato che TTF-1 e Pax8 hanno un effetto sinergico sulla trascrizione guidata dal promotore di *Tg* (Di Palma et al., 2003).

Mentre i promotori dei geni *Tg* e *TPO* presentano un alto livello di omologia, i promotori dei geni *NIS* e *TSHr* appaiono invece organizzati in maniera differente anche se sono stati evidenziati, in entrambi i promotori, ruoli importanti per gli stessi fattori trascrizionali. Ad esempio è stato dimostrato che il fattore TTF-1 lega il promotore del gene *NIS* attivandone la trascrizione (Ohmori et al., 1998). Inoltre è stato recentemente localizzato un *enhancer* a monte del promotore del gene *NIS* e la sua caratterizzazione ha portato all'identificazione di due siti di legame per Pax8 e di una sequenza *CRE-like* (Ohno et al., 1999). È stato dimostrato che l'attività trascrizionale di questo *enhancer* è strettamente influenzata dall'integrità di uno dei siti di legame per Pax8 e della sequenza *CRE-like*. Pax8 quindi si è dimostrato essere un fattore chiave anche nella regolazione di *NIS*. Recentemente sono state caratterizzate le proteine che legano la sequenza *CRE-like* e che attivano sinergicamente la trascrizione di tale gene insieme a Pax8 (Chun et al., 2004).

Il promotore del *TSHr* è stato ampiamente studiato ed è stata identificata la regione minima regolata dal TSH avente attività di promotore. All'interno di questa regione sono stati caratterizzati diversi siti di legame, alcuni per fattori non tiroide-specifici, altri per TTF-1 (Ohmori et al., 1998). Non è stata però dimostrata una rilevanza funzionale dell'eventuale legame di TTF-1 al promotore di *TSHr*.

Sono stati svolti molti studi sul rapporto tra i fattori di trascrizione tiroide specifici e l'espressione dei geni marcatori del differenziamento. Per esempio, saggi di transattivazione in cellule HeLa hanno dimostrato che TTF-1 è in grado di attivare il promotore del gene *Tg* ed, in misura minore, quello del gene *TPO* (De Felice et al., 1995; Francis-Lang et al., 1992). Il legame alla sequenza consenso in tali promotori è

permesso dall'omeodominio, un dominio proteico presente in molti fattori importanti per lo sviluppo embrionale sia in *Drosophila* che nei vertebrati (Bachiller et al., 1994). Tuttavia, la presenza di TTF-1 *in vivo* non è sufficiente a garantire l'espressione dei geni *Tg* e *TPO*; infatti l'espressione di TTF-1 in tessuti diversi dalla tiroide, come il polmone, non basta ad attivare la trascrizione dei geni *Tg* e *TPO*, bensì attiva la trascrizione dei geni polmone-specifici, come le proteine surfattanti A, B e C e le proteine secretorie delle cellule CLARA (Bruno et al., 1995; Bohinski et al., 1994; Yan et al., 1995; Kelly et al., 1996; Zhang et al., 1997).

Gli esperimenti d'inattivazione genica hanno rivelato molte funzioni importanti del fattore TTF-1 *in vivo*. Il fenotipo dei topi *knock-out* per TTF-1 è risultato piuttosto complesso, in accordo con l'espressione di tale gene in diversi organi. Topi *knock-out* per TTF-1 muoiono alla nascita probabilmente per la presenza di un polmone ipoplastico (Kimura et al., 1996). In questi topi l'ipofisi e la tiroide sono assenti mentre l'ipotalamo è anomalo. Studi successivi, condotti ai primi stadi di sviluppo embrionale, hanno dimostrato che negli embrioni *Titf1*<sup>-/-</sup> è presente il primordio tiroideo nella sua corretta posizione il quale va però incontro ad un processo apoptotico (Kimura et al., 1999). Quindi TTF-1 è un fattore essenziale per la sopravvivenza dei precursori delle cellule tiroidee ma non è richiesto per la loro iniziale formazione.

FoxE1 è stato originariamente identificato come una proteina nucleare tiroide-specifica in grado di legare una sequenza di DNA presente su entrambi i promotori dei geni *Tg* e *TPO* in seguito a stimolazione ormonale (Civitareale et al., 1989; Santisteban et al., 1992). L'analisi di topi *Foxe1*<sup>-/-</sup> ha permesso di evidenziare nei primi stadi di sviluppo embrionale un normale primordio tiroideo, che è incapace però di raggiungere la sua destinazione finale. Da ciò si deduce che Foxe1 è essenziale per la migrazione dei precursori delle cellule follicolari tiroidee ma non per la loro sopravvivenza e/o per il loro differenziamento. Il ruolo di Foxe1 nell'adulto è ancora oggetto di studi. I saggi funzionali condotti in colture cellulari hanno dimostrato che esso può funzionare da repressore trascrizionale promotore-specifico (Perrone et al., 2000), ma il suo ruolo *in vivo* potrà essere chiarito quando sarà possibile analizzare il fenotipo di topi derivanti dall'inattivazione genica condizionale di *Foxe1*.

Per quanto riguarda la proteina Pax8, sono state identificate sequenze che legano specificamente il *paired domain* sui promotori dei geni *Tg* e *TPO* (Zannini et al., 1992). Pax8 è in grado di attivare solo debolmente la trascrizione del gene *Tg* in cellule non tiroidee, come ad esempio le cellule HeLa, mentre attiva molto efficientemente quella del gene *TPO* (Zannini et al., 1992). Pax8 fa parte di una sottoclasse dei geni *Pax*, a cui

appartengono anche Pax2 e Pax5 (Walther et al., 1991; Dorfler et al., 1996), caratterizzata dalla presenza parziale di un altro dominio di legame al DNA, l'omeodominio, e da una sequenza di 8 residui amminoacidici, detta octapeptide, frapposta tra l'omeodominio ed il *paired domain*. Tuttavia, fino ad oggi non è ancora nota la funzione né dell'omeodominio parziale né dell'octapeptide. La regione carbossiterminale, che comprende il dominio di trans-attivazione (Poleev et al., 1997), è sottoposta a *splicing* alternativo che genera sei diverse isoforme della proteina (Poleev et al., 1995). L'isoforma **a**, considerata la forma *full length*, è quella maggioritaria in tiroide (Poleev et al., 1995).

Negli ultimi anni sono state ottenute almeno tre evidenze che dimostrano il ruolo fondamentale del fattore di trascrizione Pax8 nel differenziamento tiroideo.

i) La prima evidenza è stata ottenuta utilizzando il modello sperimentale delle cellule tiroidee in coltura. È stato dimostrato che in cellule PC Cl3 trasformate dall'antigene middle T di Polyoma (denominate PCPy) si perde l'espressione dei marcatori del differenziamento Tg, TPO e NIS. Questo evento si realizza in concomitanza con la mancata espressione del fattore Pax8, ma non dei fattori TTF-1 e Foxe1. L'introduzione di un vettore d'espressione codificante Pax8 in cellule PCPy, seguito dalla sintesi della proteina esogena, risulta sufficiente per riattivare l'espressione endogena di Tg, TPO e NIS e quindi per ripristinare il fenotipo differenziato delle cellule PC Cl3 (Pasca di Magliano et al., 2000).

ii) La seconda evidenza è stata ottenuta mediante l'inattivazione attraverso ricombinazione omologa del gene di Pax8 nel topo. L'analisi dei topi *Knock out* per il gene di Pax8 ha confermato il suo ruolo fondamentale in tiroide. Nonostante Pax8 sia espresso, oltre che in tiroide, anche nel cervello e nel rene, i topi privi di entrambe le copie del gene di Pax8 non presentano anomalie fenotipiche né a livello del rene né a livello del cervello. Diversamente, questi topi mostrano un difetto evidente a livello della ghiandola tiroidea, in particolare non vi sono né follicoli né cellule follicolari tiroidee ma il rudimento ghiandolare presente è quasi completamente composto dalle cellule C (Mansouri et al., 1998). Un'analisi istologica più dettagliata nei primi stadi di sviluppo embrionale ha rivelato che negli embrioni Pax8<sup>-/-</sup> il diverticolo tiroideo è capace di evaginare dall'endoderma, ma in assenza di Pax8 esso appare più piccolo di quello presente in topi normali al giorno 11.5 e completamente privo di cellule follicolari al giorno 12.5. Allora la sola presenza del fattore trascrizionale TTF-1, regolarmente espresso nei topi Pax8<sup>-/-</sup> non è sufficiente per il corretto sviluppo della ghiandola tiroidea e per la sopravvivenza delle cellule follicolari tiroidee (Mansouri et al., 1998).

iii) La terza evidenza è stata ottenuta da studi sull'uomo ed in particolare su pazienti affetti da ipotiroidismo congenito. L'ipotiroidismo congenito è una patologia endocrina comune (frequenza di 1/3500) caratterizzata da elevati livelli di TSH in risposta a ridotti livelli di ormoni tiroidei. I soggetti affetti da tale patologia presentano una funzione tiroidea difettiva dovuta nella maggioranza dei casi a difetti nell'organogenesi della ghiandola. In circa ottanta casi su cento si osserva agenesia, ectopia o ipoplasia tiroidea (De Felice et al., 2004). In similitudine con il modello murino, il ruolo di Pax8 in questa patologia sembra essere importante; infatti in pazienti affetti da ipotiroidismo congenito sporadico e familiare sono state evidenziate mutazioni missenso e non senso nella regione codificante del gene *Pax8*. (Macchia et al., 1998; Macchia et al., 1999; Vilain et al., 2001; Congdon et al., 2001; Komatsu et al., 2001).

Quindi i tre modelli descritti mostrano chiaramente il ruolo d'importanza che ricopre Pax8 all'interno del complesso meccanismo molecolare del differenziamento tiroideo.



## SCOPO DEL PROGETTO

La regolazione trascrizionale è alla base di processi quali la crescita cellulare ed il differenziamento. In un organismo adulto le cellule differenziate esprimono un sottogruppo di geni specifici, regolati soprattutto a livello trascrizionale che contribuiscono a delineare l'insieme delle proteine espresse da tali cellule e, più in generale, le funzioni che le caratterizzano. Un esempio è offerto dalle cellule follicolari tiroidee, che esprimono i geni considerati marcatori del differenziamento, rappresentati dalla tireoglobulina (Tg), tireoperossidasi (TPO), il trasportatore dello iodio (NIS) ed il recettore del TSH (TSHr). Tra i fattori di trascrizione importanti per l'espressione di questi geni vi è Pax8. Poiché nel corso degli anni esperimenti *in vitro* ed *in vivo* hanno evidenziato il ruolo fondamentale del fattore Pax8 nella determinazione e nel mantenimento del fenotipo differenziato, lo scopo di questo progetto di ricerca è stato quello d'identificare e caratterizzare proteine, che insieme a Pax8, determinino l'espressione di un *subset* di geni tiroide-specifici. Recentemente, è stata dimostrata l'interazione funzionale tra Pax8 e l'altro fattore trascrizionale tiroide specifico TTF-1 (Di Palma et al., 2003). Abbiamo quindi intrapreso una serie di studi, non ancora terminati, rivolti all'identificazione di vari fattori e co-fattori che partecipano insieme alla proteina Pax8 alla regolazione di geni tessuto-specifici e permettono il differenziamento tiroideo. A tale scopo abbiamo scelto di utilizzare e paragonare più sistemi di purificazione.

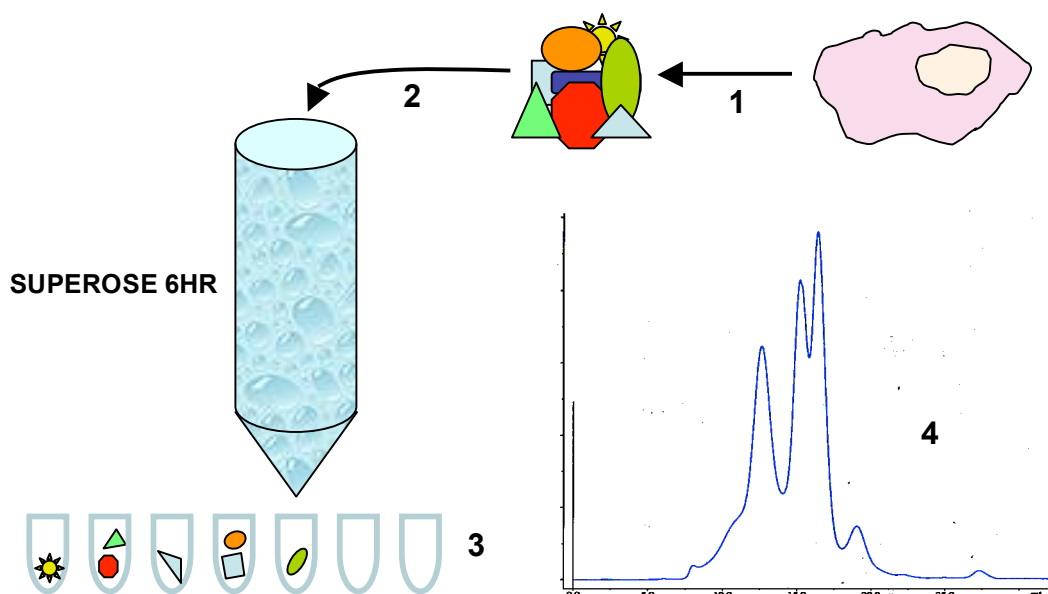
I primi tre metodi si basano sulla possibilità di isolare complessi multiproteici da un contesto fisiologico (lisati cellulari) tramite l'utilizzo di una proteina fusa ad un epitopo. Tutte le tecniche utilizzate sono state seguite da spettrometria di massa la quale fornisce informazioni sulla stechiometria delle subunità di un complesso (Zhang et al., 2000) e sulle interazioni tra le proteine presenti nel complesso stesso (Rostom et al., 2000). Il primo metodo utilizzato per isolare eventuali *partners* di Pax8 è stato il sistema 3XFLAG (SIGMA). Questo metodo si basa sulla possibilità di isolare complessi multiproteici in un singolo passaggio di purificazione. Il secondo approccio seguito è stato il moderno sistema del TAP (*Tandem Affinity Purification*). Questo sistema sfrutta la possibilità di purificare il complesso multiproteico attraverso due purificazioni sequenziali (in Tandem) e quindi, a costo di una perdita di materiale, con una maggiore affidabilità di risultati. Il terzo sistema è stato ingegnerizzato nel nostro laboratorio e segue, in via teorica, gli stessi passaggi di purificazione del TAP. La differenza tra questi due sistemi consiste nelle

caratteristiche dell'epitopo. L'ultima tecnica, ed anche la meno avveniristica, è stata il saggio del *GST-pull down* che consiste nell'isolare da un estratto proteico totale o nucleare, i possibili interattori della proteina esca tramite interazioni dirette proteina-proteina. La scelta di paragonare questi metodi di purificazione è legata al nostro interesse di isolare il maggior numero possibile d'interattori di Pax8. La speranza era di riuscire ad ottenere per ciascun metodo un risultato da complementare con gli altri risultati al fine di ottenere un quadro complessivo del complesso multiproteico. Inoltre, è verosimile che una tecnica possa fungere da controllo, positivo o negativo, nei confronti delle altre così da aumentare la veridicità del risultato finale ed eliminare, almeno in parte, il *background*.

## RISULTATI

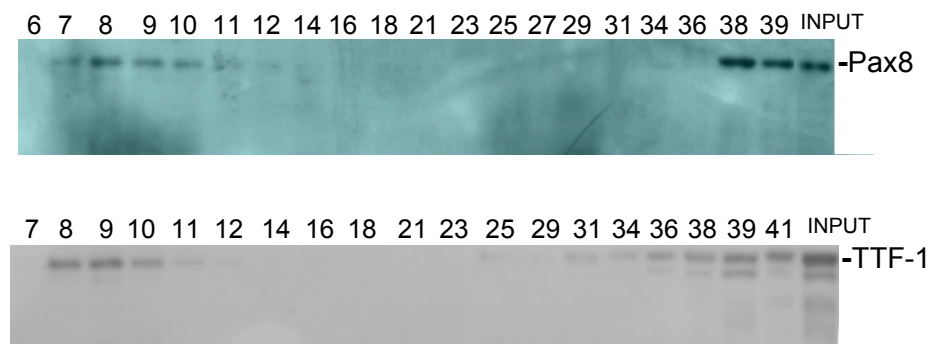
### **Analisi del complesso proteico contenente Pax8 mediante cromatografia ad esclusione molecolare.**

La determinazione ed il mantenimento di un qualsiasi fenotipo differenziato è influenzato, oltre che dai fattori trascrizionali tessuto-specifici, anche da tutti gli eventuali interattori e regolatori trascrizionali presenti nel suddetto tessuto. Il fattore trascrizionale Pax8 è stato dimostrato essere essenziale al mantenimento del fenotipo differenziato tiroideo (Pasca di Magliano et al., 2000). In più, la co-presenza dei fattori trascrizionali Pax8 e TTF-1, univocamente nella ghiandola tiroidea, suggerisce che questa combinazione possa essere responsabile della determinazione e del differenziamento dei tireociti. Per analizzare ulteriormente la relazione tra Pax8, TTF-1 ed altre eventuali proteine coinvolte nella determinazione e/o nel mantenimento del fenotipo tiroideo differenziato, è stata eseguita una cromatografia ad esclusione molecolare. A tal fine è stato preparato un estratto proteico totale da cellule PC Cl3 selezionando un metodo di lisi che salvaguardasse l'integrità di un eventuale complesso multiproteico esistente (vedi Materiali e Metodi). Tale lisato è stato filtrato attraverso una colonna ad esclusione molecolare, composta da biglie cave di agarosio (Sephacrose 6HR, GE Healthcare-Amersham Biosciences), che presenta un *range* di separazione tra  $5 \times 10^3$  e  $5 \times 10^6$  Dalton (Figura 10).



**Figura 10:** Processo schematico di cromatografia per esclusione molecolare. Le proteine estratte dalle cellule (1) vengono filtrate attraverso una colonna di biglie cave di agarosio (2), separate e raccolte (3). Il risultato viene paragonato alla curva di taratura estrapolata dalla filtrazione dei marcatori di peso molecolare (4).

La qualità di separazione della suddetta colonna è stata precedentemente valutata filtrando proteine di peso molecolare noto, i cosiddetti *standards* di peso molecolare ed utilizzando i dati ottenuti è stata disegnata una curva standard tale da poter determinare il peso molecolare apparente di ciascuna frazione. Le frazioni eluite sono state separate su SDS-PAGE al 10% ed analizzate mediante Western Blot prima con l'anticorpo policlonale anti-Pax8, poi con l'anticorpo policlonale contro la proteina TTF-1. L'immunorivelazione ha indicato che le proteine Pax8 e TTF-1 sono presenti contemporaneamente nelle frazioni 8,9,10 (Figura 11); secondo la nuova curva standard, tali frazioni contengono proteine con peso molecolare apparente compreso tra 300kDa e 500 kDa. Il segnale nelle frazioni 38 e 39, presente in entrambe le immunorivelazioni, corrisponde al peso molecolare delle singole proteine Pax8 e TTF-1 (Figura 11). La co-presenza di Pax8 e TTF-1 nelle frazioni di peso molecolare pari a 300/500 kDa ha confermato l'esistenza *in vivo* di un complesso multiproteico stabile i cui membri sono stati a lungo oggetto di studio.



**Fig. 11:** Frazionamento di Pax8 e TTF-1 mediante cromatografia ad esclusione molecolare. Il frazionamento è stato fatto con la colonna Sepharose 6HR a partire da 1.5 mg di estratto proteico totale preparato dalle cellule PC Cl3. Le frazioni indicate sono analizzate su un gel 10% SDS-PAGE ed immunorivelate con gli anticorpi contro Pax8 e TTF-1.

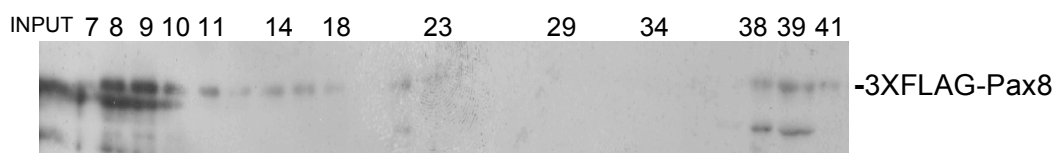
### **Purificazione del complesso nativo di Pax8.**

Allo scopo di identificare e caratterizzare le proteine che interagiscono biochimicamente con Pax8, abbiamo scelto di approcciare a differenti sistemi di purificazione per cromatografia di affinità. Il panorama scientifico in questo campo è sufficientemente ampio da permettere un'accurata selezione dei sistemi di purificazione in base alle esigenze del proprio modello in studio. Un sistema che permette la purificazione di complessi in condizione nativa, ad esempio, è il sistema 3XFLAG<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich). Questo sistema, da noi scelto, consente di effettuare purificazioni per affinità della proteina di interesse e di quelle ad essa associate dal lisato proteico cellulare.

L'epitopo FLAG<sup>®</sup> è costituito da 8 amminoacidi e permette di rivelare, immunoprecipitare e purificare proteine ricombinanti mediante l'utilizzo di anticorpi anti-FLAG altamente specifici. Il sistema 3XFLAG<sup>®</sup> migliora il precedente sistema sfruttando la fusione di 3 epitopi FLAG<sup>®</sup> alla proteina ricombinante, con un conseguente aumento della sensibilità nell'ordine di 10 volte. Per i nostri esperimenti la sequenza codificante il cDNA di Pax8 è stata subclonata nel vettore di espressione 3XFLAG<sup>®</sup>-CMV10 ed è stato verificato che la proteina di fusione fosse trascrizionalmente attiva al pari della proteina *wild-type*. In pratica, sono state eseguite trasfezioni transienti in cellule HeLa nelle stesse condizioni sperimentali in cui i costrutti *reporter* Tg-CAT e TPO-LUC (contenenti i promotori di due geni target di Pax8) sono efficientemente attivati trascrizionalmente dal fattore Pax8 *wild-type* (dati non mostrati). In seguito il vettore d'espressione ingegnerizzato 3XFLAG<sup>®</sup>-Pax8 è stato trasfettato stabilmente nelle cellule tiroidee PC Cl3 e tra i diversi cloni indipendenti, esprimenti la proteina 3XFLAG<sup>®</sup>-Pax8, è stato scelto il clone numero 8 (3XF-P8-8). Tale clone, già descritto in precedenza ed utilizzato per dimostrare l'interazione *in vivo* tra TTF-1 e Pax8 (Di Palma et al., 2003), è stato scelto tra i vari cloni stabili ottenuti perché esprime la proteina di fusione a livelli paragonabili alla proteina Pax8 endogena. Ciò è importante al fine di evitare artefatti nell'assemblaggio del complesso dovuti ad un'eccessiva espressione della proteina di fusione.

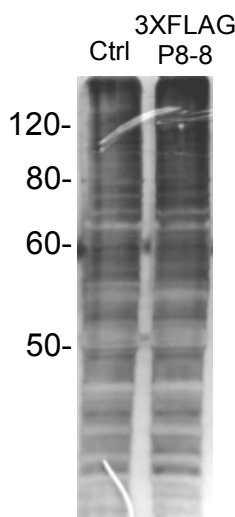
### ***Il sistema 3XFLAG<sup>®</sup>.***

Prima di procedere all'amplificazione del clone 3XF-P8-8, da usare come risorsa per purificare il complesso nativo di Pax8, abbiamo verificato che la proteina di fusione fosse capace di assemblarsi in un complesso multiproteico dello stesso peso molecolare della proteina *wild-type*. A tale scopo una piccola quantità di estratto proteico totale ottenuto dal clone 3XF-P8-8 è stato analizzato tramite cromatografia ad esclusione molecolare sulla colonna Sepharose 6HR 10-30 (GE Healthcare-Amersham Biosciences) precedentemente descritta. Come mostrato nella figura 12 la proteina 3XFLAG<sup>®</sup>-Pax8 è presente dalla frazione 8 alla frazione 10 come la proteina endogena, quindi è verosimilmente pensare che essa sia capace di legare le stesse proteine di Pax8 e di assemblarsi nello stesso complesso di peso molecolare compreso tra 300 e 500 kDa.



**Fig. 12:** Frazionamento su colonna Sepharose 6HR di 1.5 mg di estratto proteico totale preparato dal clone 3XFLAG-P8-8. Le frazioni indicate sono analizzate su un gel 10% SDS-PAGE ed immunorivelate con l'anticorpo anti-FLAG-M2<sup>®</sup> rivolto contro 3XFLAG-Pax8.

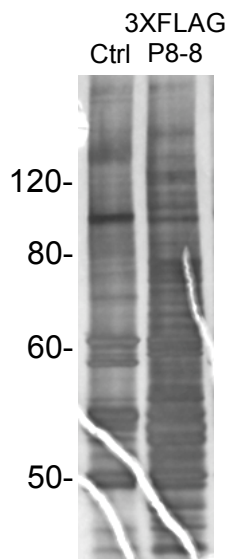
A questo punto sono stati amplificati il clone 3XF-P8-8 e le cellule PC Cl3, da usare come controllo negativo, per ottenere molti milligrammi di estratto proteico totale. Dato che l'elevata concentrazione salina presente nei protocolli di estrazione di proteine nucleari avrebbe potuto compromettere l'integrità del complesso multiproteico, per questo esperimento è stato preferito l'utilizzo di estratti proteici totali. Mentre si procedeva alla crescita del clone, è stato effettuato un esperimento pilota: piccole quantità di estratto totale ottenute dal clone 3XF-P8-8 e da cellule PC Cl3 sono state immunoprecipitate su una resina di agarosio su cui è legato l'anticorpo specifico ANTI-FLAG-M2<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich). Le proteine legate alla resina tramite l'anticorpo sono state prima eluite mediante competizione con un eccesso di peptide 3XFLAG<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich), poi risolte su minigel SDS-PAGE al 10% e visualizzate mediante colorazione al nitrato d'argento. La figura 13 mostra che molte proteine si legano aspecificamente alla resina ed altrettanto aspecificamente sono eluite dal peptide 3XFLAG<sup>®</sup>.



**Fig. 13:** Identificazione di un complesso proteico di Pax8 in cellule esprimenti 3XFLAG-Pax8. Una quantità pari a 10mg di lisato totale preparato dal clone 3XFLAG-P8-8 e dalle cellule PC Cl3 e' stata incubata con la resina anti-FLAG<sup>®</sup> affinity gel; le proteine sono eluite dalla resina con un eccesso di peptide 3XFLAG<sup>®</sup> e separate su un gel 10% SDS-PAGE. La colorazione al nitrato d'argento mostra molte bande aspecifiche in entrambi i canali.

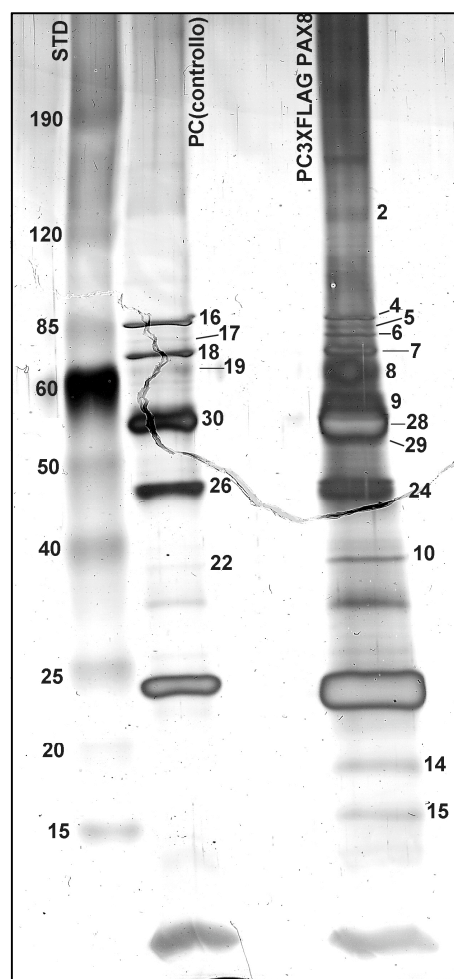
Per cercare di ridurre il *background* è stato introdotto un passaggio di *pre-clearing* dell'estratto proteico, utilizzando una resina su cui sono legate delle IgG murine.

Tale passaggio, consigliato dal servizio tecnico della Sigma-Aldrich, provvederebbe ad eliminare molte delle proteine che legano specificamente la resina di agarosio. In pratica, gli estratti totali ottenuti dal clone 3XF-P8-8 e dalle PC Cl3, prima dell'esperimento di immunoprecipitazione, sono stati incubati per 3h con la resina-IgG in modo da privare entrambi gli estratti delle proteine che costituiscono il *background*. Le proteine eluite da questa prima resina sono state incubate con la resina ANTI-FLAG-M2® ed eluite da quest'ultima per competizione col peptide 3XFLAG® come precedentemente descritto. Gli eluati sono stati separati su un gel con gradiente 8-15% di poliacrilammide e poi rivelati mediante colorazione al nitrato di argento (Figura 14). Il passaggio di *pre-clearing* con la resina-IgG ha effettivamente ridotto di molto il *background*.



**Fig. 14:** Identificazione di un complesso proteico di Pax8 in cellule esprimenti 3XFLAG-Pax8. Una quantità pari a 10mg di lisato totale preparato dal clone 3XFLAG-P8-8 e dalle cellule PC Cl3 è stata incubata prima con una resina di agarosio-IgG, poi con la resina anti-FLAG affinity gel. Le proteine legate sono eluite dalla resina con un eccesso di peptide 3XFLAG e separate su un gel 8%-15% SDS-PAGE. La colorazione al nitrato d'argento mostra l'effettiva diminuzione del background.

Alla luce di questo risultato tale esperimento d'immunoprecipitazione è stato ripetuto in larga scala al fine d'identificare le bande differenziali. A tale scopo si è partiti da una quantità di estratto totale pari a 150 mg, che è stato sottoposto a tutti i passaggi di purificazione sopra descritti. Le proteine rivelate attraverso colorazione al nitrato d'argento, che sembravano essere specifiche del clone 3XF-P8-8 (Figura 15), sono state analizzate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF, in collaborazione con il dott. A. Scaloni dell'ISPAAM-CNR di Napoli. L'identificazione proteica, purtroppo, non ha dato il risultato atteso, in quanto ha indicato la presenza delle stesse proteine in entrambi gli estratti (Tabella 1).



**Fig. 15:** Purificazione per affinità del complesso nativo di Pax8. Analisi SDS-PAGE su gel 8%-15% e colorazione al nitrato d'argento di proteine eluite da 150 di estratto proteico totale preparato da cellule PC Cl3 (controllo) e dal clone 3XFLAG-P8-8. Le bande contrassegnate dai numeri sono state sottoposte ad identificazione mediante spettrometria di massa.

Solo due proteine, mortalina ed un simil-fattore di traduzione IF2, sono risultate essere specificamente presenti nel clone 3XFLAG-P8-8 insieme alla proteina esca 3XF-Pax8 (Tabella 1), ma si tratta di proteine citoplasmatiche, per cui è plausibile immaginare che siano dei contaminanti. La problematica dell'elevato background dipende ovviamente dalla sorgente di materiale utilizzato, che nel nostro caso è la linea cellulare tiroidea di ratto PC Cl3. Dopo aver fatto svariati tentativi per migliorare le condizioni sperimentali di questa cromatografia di affinità, abbiamo ritenuto di poter concludere che, per poter utilizzare questa tecnica al fine di isolare interattori di Pax8 in cellule tiroidee, è necessario introdurre delle significative modifiche, tese principalmente a ridurre il *background* senza però intaccare la specificità di legame degli interattori con la proteina esca. In aggiunta, è verosimile pensare di separare gli eluati su gel bidimensionali in modo da non avere sovrapposizioni di bande che potrebbero impedire l'identificazione di proteine presenti in minore quantità. È di auspicio che tali cambiamenti possano essere



sufficienti a rendere questa tecnica efficiente per la purificazione di complessi multiproteici in cellule tiroidee.

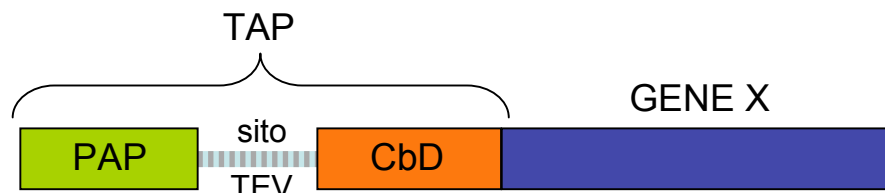
#	NOME	CODICE
<b>2</b>	Similar to translation initiation Factor IF-2	XP_129766
<b>4</b>	78 kDa glucose regulated protein (GRP78)	P06761
<b>16</b>	78 kDa glucose regulated protein (GRP78)	P06761
<b>5</b>	Stress-70 protein (Mortalin)	P48721
<b>6</b>	Heat shock cognate 71 kDa protein	P08109
<b>17</b>	Heat shock cognate 71 kDa protein	P08109
<b>7</b>	Protein arginin N-methyltransferase 5	Q8C1G8
<b>18</b>	Protein arginin N-methyltransferase 5	Q8C1G8
<b>8</b>	Bovine serum albumin	P02769
<b>19</b>	Bovine serum albumin	P02769
<b>9</b>	Paired box protein Pax8 <i>immunoglobulin</i>	Q00288
<b>28</b>	Paired box protein Pax8 <i>immunoglobulin</i>	Q00288
<b>29</b>	Paired box protein Pax8 <i>immunoglobulin</i>	Q00288
<b>30</b>	<i>immunoglobulin</i>	
<b>24</b>	Ac2-269 (similar to methylosome protein 50) actin	Q7TPI7
<b>26</b>	Ac2-269 (similar to methylosome protein 50) actin	Q7TPI7
<b>10</b>	Thymidilate synthase Paired box protein Pax8	P45352 Q00288
<b>22</b>	Thymidilate synthase	P45352
<b>14</b>	<i>immunoglobulin</i>	
<b>15</b>	Peptidoglycan recognition protein	Q8SPP7

**Tabella 1:** Proteine identificate mediante l'analisi MALDI-TOF di un esperimento di purificazione 3XFLAG®. In nero sono segnate le proteine identificate nel clone 3XFLAG-P8-8. In grigio quelle in PC Cl3 (controllo).

### *L'alternativa: il sistema TAP.*

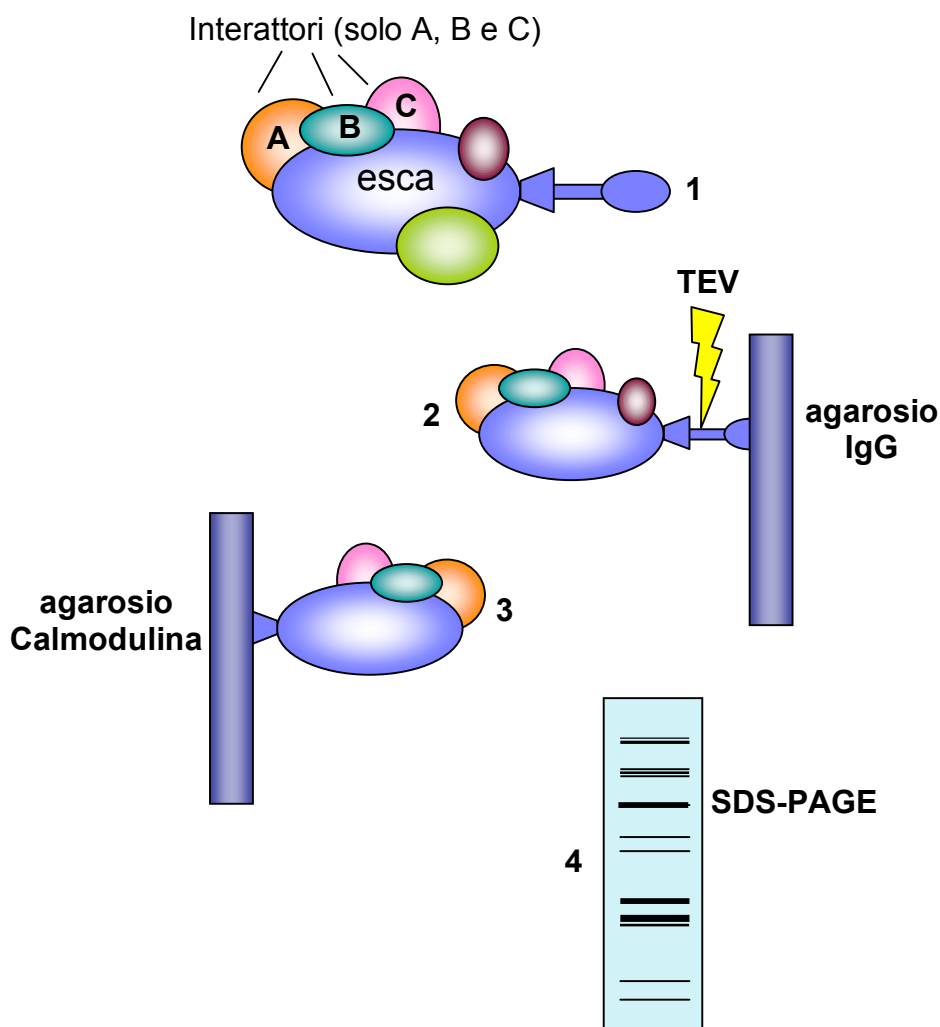
Avendo accertato l'esistenza di un complesso multiproteico contenente Pax8 ed avendo incontrato i precedentemente descritti problemi di purificazione con il sistema 3XFLAG®, abbiamo deciso di mettere a punto per il nostro progetto un nuovo metodo di purificazione: il TAP, ossia il *Tandem Affinity Purification*.

Tale tecnica permette di purificare un complesso proteico mediante due cromatografie di affinità sequenziali, ed in questo modo si riduce considerevolmente il livello di interattori aspecifici e contemporaneamente si incrementa la veridicità del risultato. Più specificamente la *Tandem Affinity Purification* (TAP) si basa sulla possibilità di purificare una proteina due volte consecutive (cioè in *tandem*) e, in base alle condizioni saline, di purificare contemporaneamente con la proteina d'interesse anche i suoi eventuali interattori. Entrando nello specifico, il TAP è un epitopo costituito in sequenza da: il dominio peptidico della proteina A riconosciuto aspecificamente dalle immunoglobuline (PAP), il sito di taglio della *Tobacco Etch Virus* (TEV), il dominio di legame alla Calmodulina (CbD) (Figura 16). Il PAP serve per immunoprecipitare la proteina di fusione con una resina di agarosio legata alle IgG. Successivamente, la resina viene lavata e la proteina di fusione eluita mediante un taglio enzimatico sito-specifico da parte di una proteasi virale (TEV) assente in cellule eucariotiche. In questo passaggio è racchiusa l'essenza del sistema TAP, ossia il vantaggio di poter eluire una proteina di fusione dalla resina in condizioni native. Per evitare contaminazioni del campione, nel TAP è stato inserito un ulteriore passaggio di purificazione grazie al dominio CbD. Il vantaggio dell'utilizzo del CbD consiste nel fatto che l'efficienza di legame di tale dominio è sensibile alla concentrazione di calcio. Infatti, il CbD si lega ad una resina legata a Calmodulina solo in presenza di ioni calcio. Per cui, per eluire la proteina di fusione dalla resina-Calmodulina basta utilizzare un chelante del calcio come, ad esempio l'EGTA.



**FIGURA 16:** Struttura dell'epitopo TAP che permette di effettuare due purificazioni *in tandem* della stessa proteina di fusione e dei suoi eventuali interattori.

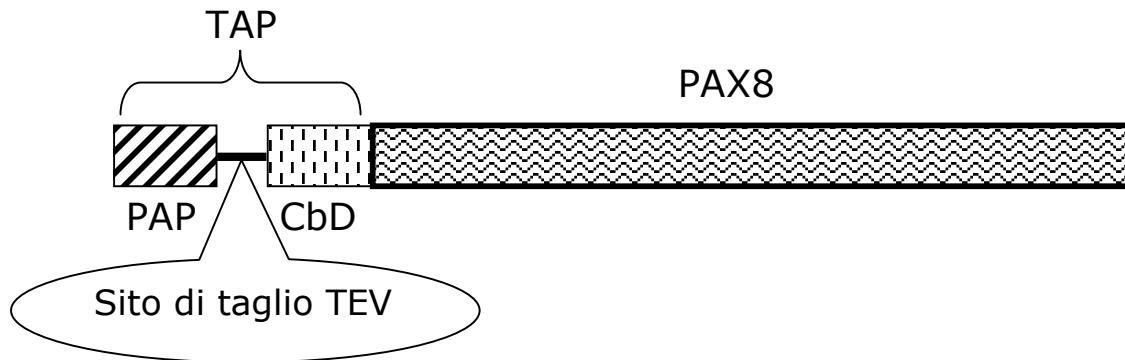
Tali condizioni garantiscono al complesso multiproteico di conservarsi in un ambiente nativo e stabile (Rigaut et al., 1999; Forier et al., 2002). Chiaramente assieme alla proteina di fusione, vengono eluiti tutti gli eventuali interattori (Figura 17).



**Figura 17:** purificazione *in tandem* di un complesso multiproteico. La doppia purificazione dovrebbe ridurre i falsi positivi, ovvero gli interattori aspecifici. Il complesso multiproteico, una volta formatosi (1), viene purificato una prima volta (2) e poi una seconda (3) prima di essere eluito e corso su gel SDS-PAGE (4).

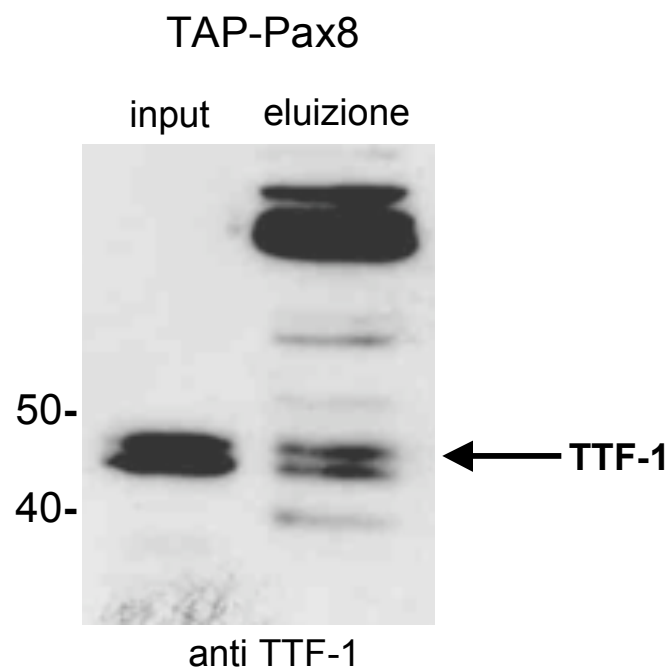
Nel nostro caso abbiamo fuso l'epitopo TAP alla porzione amminoterminale del fattore trascrizionale Pax8 ed abbiamo generato dei cloni di cellule tiroidee PC Cl3 che esprimessero stabilmente la proteina di fusione (Figura 18). Abbiamo controllato che i livelli di espressione fossero paragonabili a quelli della proteina Pax8 endogena, e abbiamo accertato che la proteina TAP-Pax8 fosse funzionalmente attiva. L'intero processo di generazione e selezione dei cloni, come per il già descritto FLAG®-Pax8, è riportato accuratamente nella sezione Materiali e Metodi. È inoltre utile ricordare che la proteina di fusione TAP-Pax8 risulta migrare in SDS PAGE ad un'altezza ben

diversa rispetto a quella della sola proteina Pax8, ragion per cui, è stato possibile scegliere di utilizzare per le immunorivelazioni l'anticorpo specifico anti-Pax8.



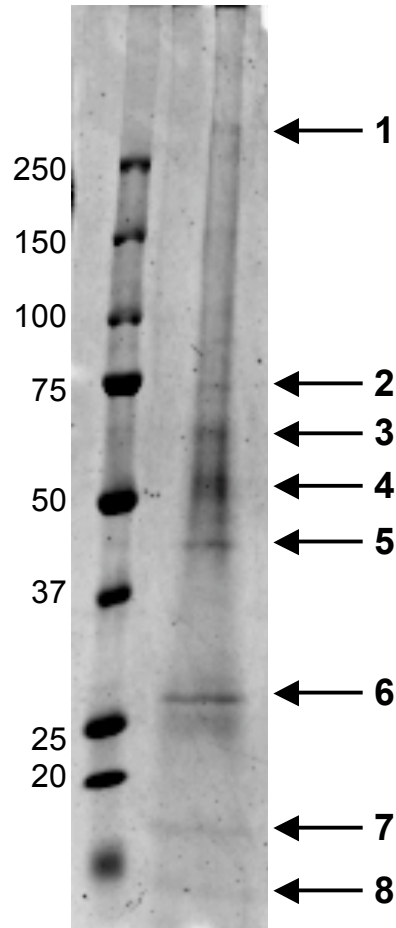
**FIGURA 16:** Struttura della proteina di fusione TAP-Pax8.

Una volta selezionato il clone con le giuste caratteristiche, abbiamo preparato estratti proteici in larga scala di cellule di tiroide PC Cl3 e del clone stesso esprimente TAP-Pax8. Allo stesso tempo, abbiamo messo a punto il protocollo di purificazione della proteina di fusione in piccola scala, controllando il risultato mediante western blot e rivelando la presenza dell'unico interattore noto e rivelabile di Pax8, cioè TTF-1 (Figura 19).



**Figura 19:** Test di funzionalità in piccola scala della purificazione

Nella figura 20 è rappresentato il gel colorato al nitrato d'argento di un esperimento di immunoprecipitazione in larga scala appena descritto. Anche in questo caso il risultato non è stato quello atteso, dato che non siamo riusciti ad identificare nessun interattore plausibile per il fattore trascrizionale Pax8 (Tabella 2).



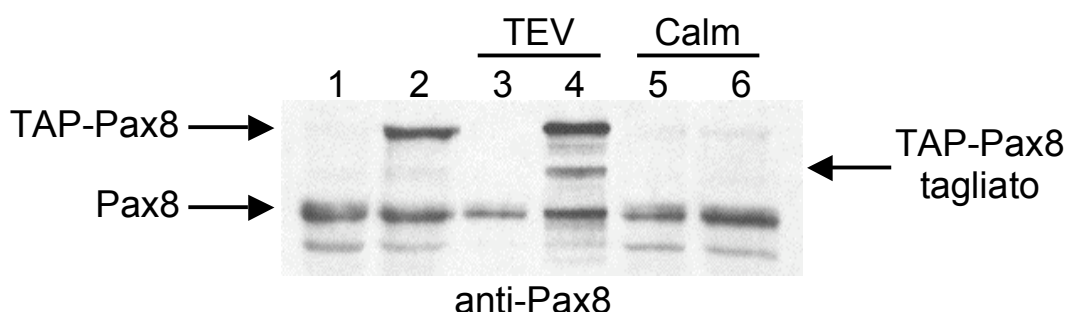
**Fig. 20:** Identificazione di un complesso proteico di Pax8 in cellule esprimenti TAP-Pax8. Una quantità pari a 150mg di lisato totale preparato dal clone esprimente stabilmente TAP-Pax8 è stata processata secondo il protocollo di purificazione TAP. Le proteine sono eluite e separate su un gel 8%-15% SDS-PAGE. La colorazione al nitrato d'argento mostra le bande corrispondenti alle proteine purificate.

Per andare a fondo al problema in questione, abbiamo deciso di analizzare punto per punto tutti i passaggi di purificazione del sistema TAP. La prima incubazione dell'estratto proteico con la resina-IgG avviene in condizioni ottimali con un'altissima specificità delle IgG per il dominio PAP e, quindi, per la proteina di fusione TAP-Pax8. Continuando i nostri test, abbiamo scoperto che la fase critica del processo è quella del taglio proteolitico con l'enzima TEV. Il sito di taglio, come già descritto, si trova in una regione peptidica tra il PAP e il CbD, ragion per cui l'accessibilità dell'enzima al sito di taglio può essere compromessa. Per analizzare approfonditamente il livello di taglio della TEV, abbiamo messo a punto dei saggi enzimatici in vitro rivelabili mediante la tecnica del western blot.

#	NOME	CODICE
1	Spectrin beta chain	Q62261
2	78 kDa glucose regulated protein (GRP78)	P07823
3	Acyl-CoA family member 9	Q8JZN5
4	ATP syntase alpha chain, mitochondrial precursor Tubulin beta-1 chain Tubulin alpha-1 chain	P15999 P68372 P68361
5	Actin, cytoplasmic 1 (beta-actin) 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	Q71FK5 P13437
6	Genome polyprotein TEV Electron transfer flavoprotein beta subunit (beta-ETF)	P04517 Q9DCW4
7	Cheratine	
8	Lysozyme C, type P precursor	P17897

**Tabella 2:** Proteine identificate mediante l'analisi MALDI-TOF dopo un esperimento TAP.

Abbiamo preso piccole quantità di estratto proteico dal clone che esprime stabilmente la proteina di fusione TAP-Pax8 e lo abbiamo incubato con quantità crescenti di enzima TEV. Abbiamo fatto migrare su SDS-PAGE tali estratti e abbiamo rivelato la percentuale tagliata della proteina di fusione TAP-Pax8 mediante l'anticorpo specifico anti-Pax8. Come mostrato in figura 21, il taglio proteolitico della TEV è poco efficiente, e questo è un limite per la riuscita dell'intero esperimento. Andando avanti nei test, abbiamo determinato che il legame della proteina di fusione con la resina-Calmodulina, dopo il taglio proteolitico, è anch'esso poco efficiente, tale da compromettere la resa dell'esperimento se addizionato alla poca selettività di taglio da parte della proteasi TEV.



**Figura 21:** Test di taglio e legame alla resina agarosio-Calmodulina sul clone esprimente TAP-Pax8 (canali 2, 4, 6) e sul controllo PC Cl3 (canali 1, 3, 5). L'efficienza di taglio da parte della proteasi TEV è molto bassa (3, 4) e, se associata alla scarsa capacità di legame della resina agarosio-Calmodulina (5, 6), può compromettere tutto il sistema di purificazione TAP.

A ciò c'è da aggiungere che la quantità di materiale di partenza, ossia di estratto proteico, da utilizzare per un esperimento di TAP deve essere molto superiore a quella utilizzata dalle più tipiche cromatografie d'affinità. Questo perché la perdita di materiale durante le fasi del processo TAP, e soprattutto durante il taglio TEV è enorme. Queste problematiche da noi messe in evidenza, sono in realtà note ai laboratori che utilizzano il sistema TAP. Tuttavia, utilizzando questi ultimi prevalentemente le cellule di lievito come sorgente di estratto proteico, risulta più facile e fattibile superare le necessità di grandi quantità di materiale di partenza. Nel nostro caso, utilizzando estratti proteici preparati da cellule epiteliali che crescono in aderenza, abbiamo dovuto concludere che il sistema TAP non si confà alle possibilità nonché alle linee guida del laboratorio.

Tuttavia, prima di abbandonare il TAP, abbiamo controllato la conformazione tridimensionale della proteina di fusione TAP-Pax8 mediante un software gratuito. Abbiamo così scoperto che la proteina di fusione ha assunto una conformazione tridimensionale tale da non permettere alla proteasi virale TEV di effettuare liberamente il taglio proteolitico, mettendo così ulteriormente in crisi l'intero sistema di purificazione studiato.

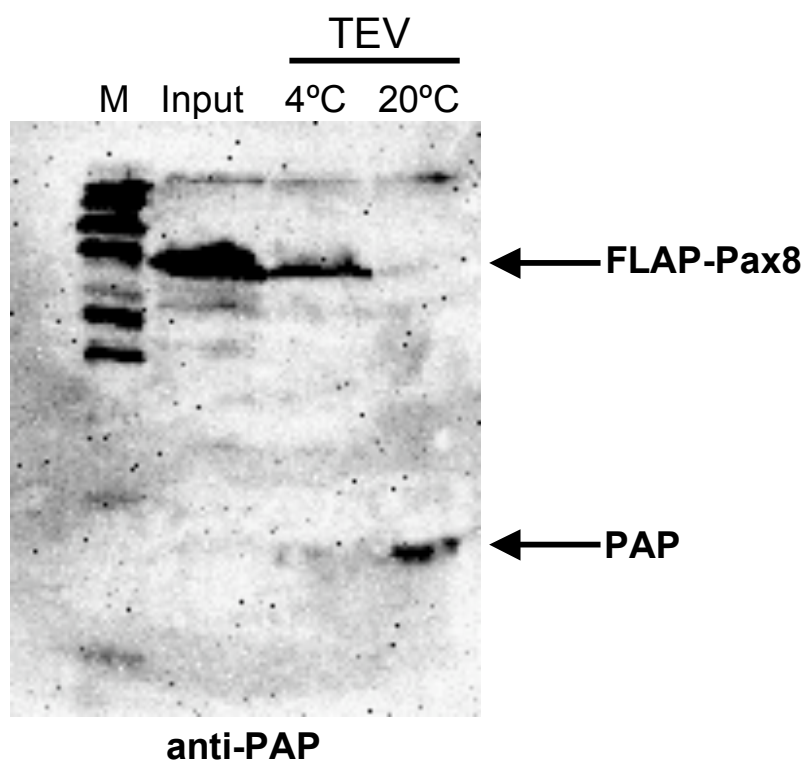
### *L'evoluzione del sistema TAP: il FLAP.*

Nonostante le difficoltà incontrate durante i due precedenti processi di purificazione descritti, abbiamo pensato di tentare un ulteriore approccio biochimico mantenendoci in linea con le tecnologie utilizzate finora. Il fascino del sistema TAP e la selettività del sistema FLAG<sup>®</sup> ci hanno dato le motivazioni necessarie per mettere a punto un metodo di purificazione abbastanza innovativo tale da sfruttare a pieno le caratteristiche dei due sistemi precedentemente utilizzati. Abbiamo quindi deciso di fondere il metodo del TAP e quello del FLAG<sup>®</sup> in un nuovo sistema di purificazione mai utilizzato prima e da noi battezzato FLAP (**FLAG<sup>®</sup>-TAP**). Tale sistema si struttura sulla capacità di purificazione in *tandem*, tipico del TAP, sommata con le opportune modifiche di sensibilità acquisite dal FLAG<sup>®</sup>. Più nello specifico, abbiamo sostituito, all'interno dell'epitopo TAP, il dominio di legame alla Calmodulina (CbD) con la sequenza 3XFLAG<sup>®</sup>. In più abbiamo ampliato le regioni "spaziatrici" tra i domini PAP e 3XFLAG<sup>®</sup> in modo da rendere la sequenza di taglio proteolitico maggiormente accessibile alla proteasi TEV (Figura 22).



**Figura 22:** Struttura dell'epitopo FLAP generato dalla fusione di una parte del TAP (PAP- sito TEV) con il 3XFLAG®. Il FLAP è un epitopo del tutto innovativo nel suo genere che abbina i vantaggi di due delle tecnologie più utilizzate nel campo della proteomica.

Dopo aver subclonato la sequenza codificante il cDNA di Pax8 in un vettore contenente il peptide FLAP da noi ingegnerizzato, abbiamo effettuato dei test focalizzando la nostra attenzione anzitutto sull'efficienza di taglio da parte della stessa TEV. La figura 23 mostra l'enorme miglioramento di efficienza di taglio proteolitico del FLAP da parte della proteasi virale.

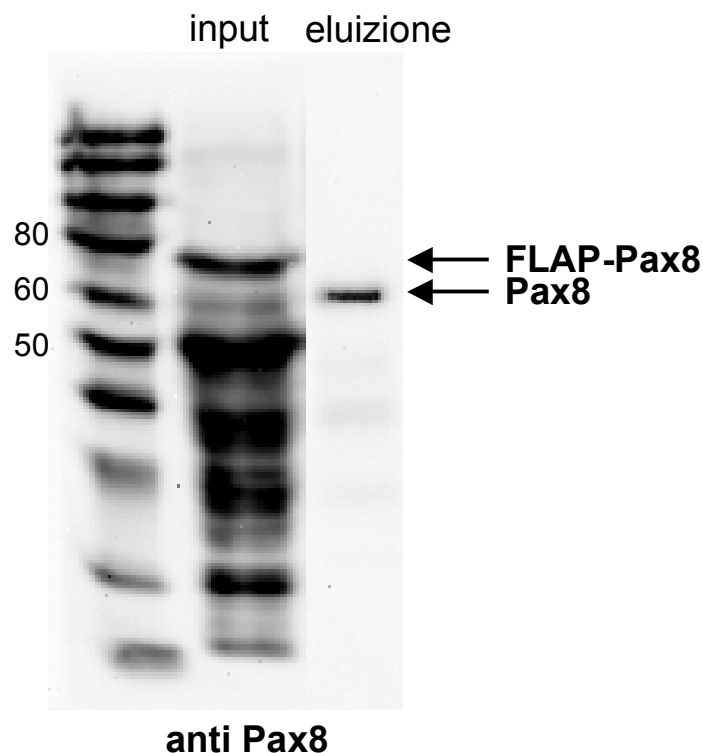


**Figura 23:** Prova di taglio TEV della proteina FLAP-Pax8 in condizioni diverse. La proteina di fusione FLAP-Pax8 è tagliata con maggiore efficienza rispetto alla proteina TAP-Pax8. La rivelazione con l'anticorpo anti-PAP permette di identificare anche il peptide tagliato.

Abbiamo constatato che la proteina di fusione FLAP-Pax8 fosse trascrizionalmente attiva trasfettando il vettore contenente il cDNA della proteina stessa in cellule HeLa, nelle condizioni sperimentali in cui i costrutti *reporter* Tg-CAT e TPO-LUC (contenenti i promotori di due geni target di Pax8) sono efficientemente attivati



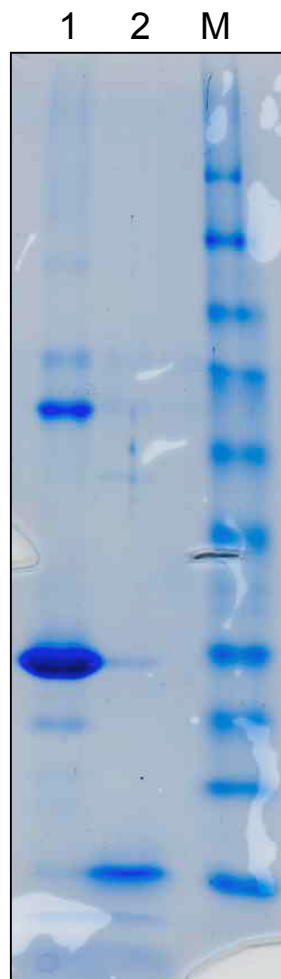
trascrizionalmente dal fattore Pax8 *wild-type* (dati non mostrati). Abbiamo poi generato un clone di cellule tiroidee PC Cl3, esprimenti stabilmente la proteina di fusione FLAP-Pax8, da cui abbiamo prodotto estratti proteici in larga scala per effettuare diverse cromatografie. In primo luogo, per essere certi che il processo di purificazione fosse corretto, abbiamo effettuato una purificazione in piccola scala utilizzando l'estratto proteico del clone esprimente FLAP-Pax8 ed abbiamo analizzato il risultato mediante western blot utilizzando l'anticorpo specifico di Pax8 (Figura 24).



**Figura 24:** Purificazione in piccola scala FLAP-Pax8 in cui si osserva il recupero di Pax8 al termine dell'intero processo di purificazione.

Poi, come mostrato nella figura 25, abbiamo effettuato un esperimento di purificazione FLAP in larga scala ed abbiamo colorato il gel con uno speciale Coomassie (Colloidal Coomassie-Invitrogen). Com'è ben visibile, la quantità di proteina di fusione purificata risulta essere talmente esigua da non essere rivelabile con la colorazione al Coomassie colloidale, colorazione peraltro equivalente a quella al nitrato d'argento. Abbiamo quindi potuto determinare che le modifiche apportate al sistema TAP che hanno portato all'ingegnerizzazione del metodo di purificazione FLAP non sono sufficienti per isolare gli interattori biochimici di Pax8. Questo è verosimilmente dovuto ad una ingente perdita di materiale durante l'intero processo di purificazione. Dopo quest'ultima esperienza abbiamo concluso che il complesso

multiproteico del fattore trascrizionale Pax8, non è isolabile, in condizioni native, con le tecnologie da noi impiegate finora.



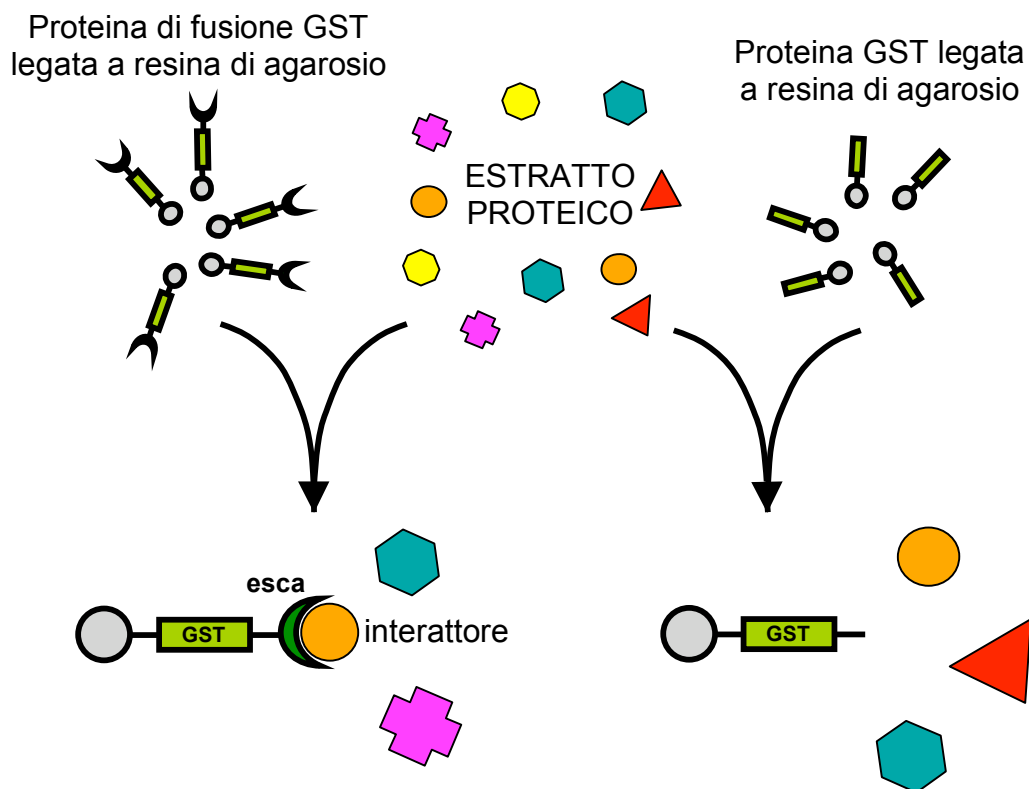
**Figura 25:** Coomassie colloidale di un gel 8%-15% in cui sono state fatte correre le eluizioni di un esperimento FLAP (canale 2) e di un controllo PC (canale 1). Com'è ben visibile la quantità di proteine eluite da 150 mg di estratto proteico del clone FLAP è troppo esigua per essere rivelabile con il Coomassie colloidale.

### *L'ultima risorsa: il sistema del GST.*

Contemporaneamente all'utilizzo delle metodiche sopra descritte (3XFLAG®, TAP e FLAP) e considerando le difficoltà incontrate, è stato messo a punto un saggio di GST *pull-down* in grande scala, sempre allo scopo di isolare le proteine appartenenti al complesso multiproteico contenente Pax8.

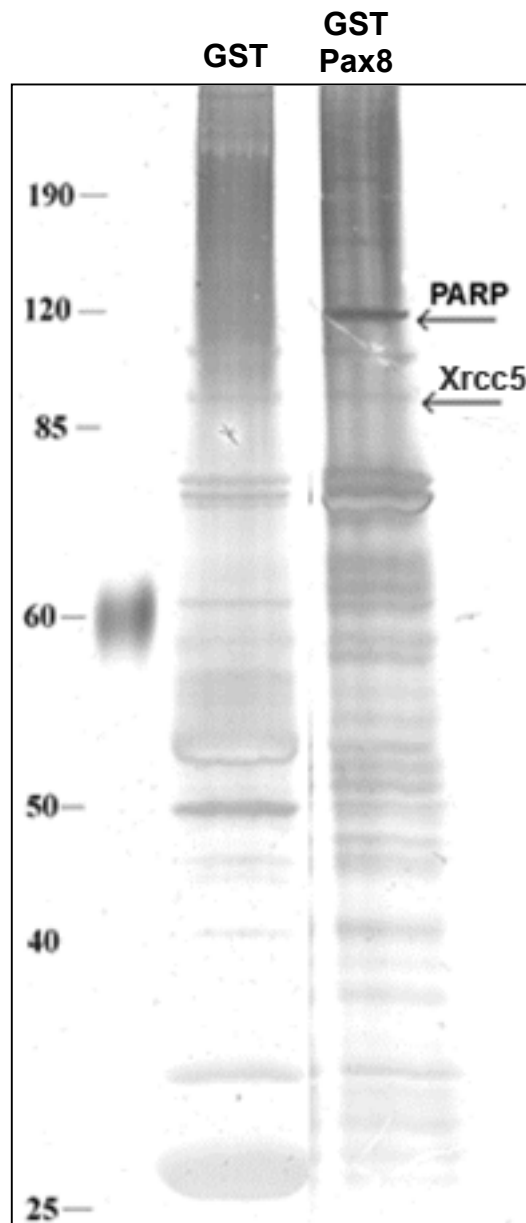
L'analisi di interattori molecolari mediante la tecnica del GST *pull-down* è stata messa a punto ormai da diversi anni (Current Protocols, Wiley 1996). D'altra parte, in compenso ad una apparente obsolescenza, tale analisi, proprio in virtù di un enorme utilizzo e di un progressivo perfezionamento, vanta un'incredibile affidabilità

(Figura 26). Tuttavia, come per ogni tecnica, al GST *pull-down* non mancano dei peculiari limiti invalicabili. In prima analisi, bisogna considerare che la proteina di fusione GST-esca viene prima prodotta e purificata da cellule batteriche per poi essere utilizzata con estratti proteici di cellule di mammifero. Questo processo fa sì che la proteina GST-esca non subisca le dovute modificazioni terziarie e quaternarie; come conseguenza si ha la possibile perdita di alcuni interattori dell'esca. In secondo luogo dobbiamo analizzare il metodo di purificazione degli interattori. Il protocollo del *pull-down* prevede un'incubazione dell'estratto proteico con la proteina di fusione GST-esca e questo comporta, al contrario dell'immunoprecipitazione, che i complessi multiproteici preformati all'interno della cellula vengano esclusi dalla "pesca" a vantaggio di interattori singoli. Ossia, sebbene la tecnica assicuri l'identificazione di interattori molecolari, la ricostruzione dell'eventuale complesso proteico risulta più laboriosa e complicata di quanto atteso. È verosimile infatti che proteine con funzioni differenti, nonché appartenenti a complessi proteici diversi, vengano eluite dallo stesso GST *pull-down* in quanto singoli interattori della proteina esca. Questo quadro rende difficoltosa una qualunque ricostruzione dei molteplici complessi a cui appartiene la proteina esca. Tali motivi ci avevano inizialmente indotto ad utilizzare gli altri approcci precedentemente descritti.



**Figura 26:** Procedimento schematico di un GST *pull-down* con controllo. Gli interattori vengono rivelati solo nell'esperimento con la proteina di fusione GST.

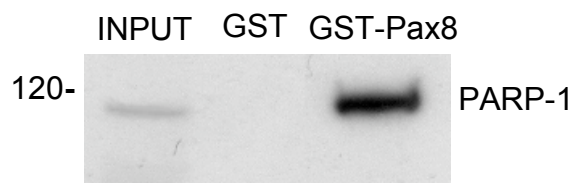
La proteina di fusione da noi utilizzata è stata, ovviamente, GST-Pax8. Tale proteina è stata precedentemente descritta ed utilizzata per dimostrare l'interazione tra Pax8 e TTF-1 (Di Palma et al., 2003) nonché per effettuare uno *screening* di una libreria di espressione fagica (Nitsch et al., 2004). In questo caso, l'esperimento di *pull-down* è stato svolto incubando inizialmente circa 150mg di estratto totale con la sola proteina GST legata ad una resina di agarosio. Questo passaggio di *pre-clearing* è servito per eliminare dall'estratto la maggior parte delle proteine che si sarebbero legate alla porzione GST della proteina di fusione GST-Pax8. In seguito, come schematizzato in figura 26, l'eluato è stato diviso in due ed incubato per metà con la resina di agarosio legata alla proteina di fusione GST-Pax8 e per metà, come controllo negativo, con la stessa resina legata alla sola proteina GST. A questo punto le proteine legate a GST-Pax8 e a GST sono state eluite, caricate su un gel preparativo con gradiente 8-15% di poliacrilammide e visualizzate mediante colorazione al nitrato d'argento. Nella figura 27 è mostrato il gel con le bande specifiche presenti nell'eluato dalla proteina GST-Pax8 rispetto al controllo, ossia dall'eluato della sola GST. Diverse bande differenziali sono state escisse dal gel e sottoposte ad identificazione mediante spettrometria di massa MALDI-TOF. Purtroppo, la maggioranza delle bande sono risultate essere frammenti della proteina GST-Pax8 che, durante la sintesi nelle cellule batteriche, viene evidentemente sottoposta a processi proteolitici. Di conseguenza tali frammenti, essendo presenti in quantità elevate proprio perché derivati dall'esca, hanno mascherato eventuali bande differenziali e quindi è stato possibile effettuare l'identificazione solo per due bande di peso molecolare pari a 83kDa e 113kDa. L'analisi ha rivelato che tali bande corrispondono, rispettivamente, alle proteine Xrcc5 e PARP-1 (Figura 27). Quest'ultimo è un fattore nucleare implicato nel controllo della stabilità genomica e nei processi di riparo del DNA (de Murcia and Menissier de Murcia, 1994), mentre Xrcc5 (anche chiamata Ku80) è una proteina strettamente correlata a PARP-1 e al riparo del DNA (Tong et al., 2002). Come controllo dell'intero esperimento, una piccola quantità degli eluati "esperimento" e "controllo" è stata caricata su un mini-gel SDS-PAGE ed analizzata mediante Western blot con l'anticorpo contro TTF-1, unico interattore noto rivelabile di Pax8. TTF-1 è risultato essere legato specificamente alla sola proteina GST-Pax8, come negli esperimenti descritti in un lavoro precedente (Di Palma et al., 2003).



**Figura 27:** GST *pull-down* in larga scala in cui le proteine GST e GST-Pax8 sono incubate con il lisato proteico totale ottenuto dalle cellule PC C13. Le proteine che interagiscono con GST e GST-Pax8 sono caricate su un gel 8%-15% e visualizzate mediante colorazione al nitrato d'argento. Le frecce indicano le proteine che interagiscono con con GST-Pax8.

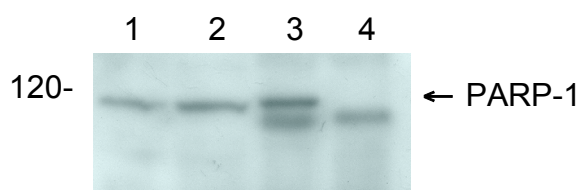
### **Pax8 e PARP-1 interagiscono *in vitro* ed *in vivo*.**

Per validare l'identificazione di PARP-1 come interattore di Pax8, è stato ripetuto l'esperimento di GST-*pull down* e questa volta l'eluato è stato separato su un mini-gel e sottoposto ad analisi di Western blot con uno specifico anticorpo monoclonale contro la proteina PARP-1 (Alexis). La figura 28 mostra la presenza della proteina PARP-1 specificamente nell'eluato ottenuto dall'incubazione dell'estratto proteico con la proteina di fusione GST-Pax8.



**Figura 28:** Interazione fisica tra PARP-1 e Pax8 dimostrata con un saggio di GST pull-down con le proteine GST e GST-Pax8 immobilizzate sulla resina glutatione-sefarosio. 3 mg di estratto proteico preparato dalle cellule PC Cl3 sono incubati con GST e GST-Pax8. Le proteine eluite dalle resine sono separate su un gel 10% SDS-PAGE ed analizzate mediante Western blot con l'anticorpo anti-PARP-1.

Per dimostrare l'interazione tra le proteine PARP-1 e Pax8, *in vivo*, sono stati preparati estratti proteici totali dal clone 3XF-P8-8 e dalle cellule PC Cl3; tali estratti sono stati immunoprecipitati usando la metodica precedentemente descritta per l'interazione tra Pax8 e TTF-1 (Di Palma et al., 2003). Anche in questo caso, l'immunorivelazione con l'anticorpo monoclonale anti-PARP-1 ha mostrato la presenza della proteina PARP-1 solo nell'estratto preparato dal clone 3XF-P8-8 (Figura 29). Sebbene quest'interazione getti le basi per un ulteriore ed approfondito studio sulla funzione biologica dell'interattore PARP-1, suddetta interazione biochimica è ancora oggetto di studio.

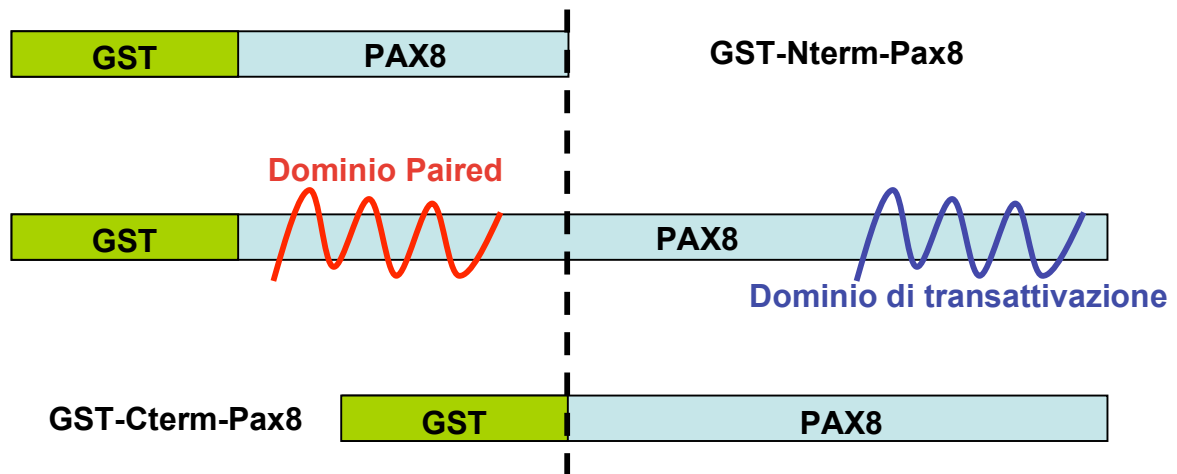


**Figura 29:** Interazione fisica tra PARP-1 e Pax8 dimostrata mediante coimmunoprecipitazione. 2 mg di estratto proteico totale sono incubati con anti-FLAG® agarosio affinity gel. Le proteine eluite sono separate su un gel 10% SDS-PAGE ed analizzate mediante Western blot con l'anticorpo anti-PARP-1. Canali: 1-Input PC Cl3; 2-Input 3XFLAG-P8-8; 3-eluito dal clone 3XFLAG-P8-8; 4-eluito dalle cellule PC Cl3.

### Modifiche per migliorare il sistema GST *pull-down*.

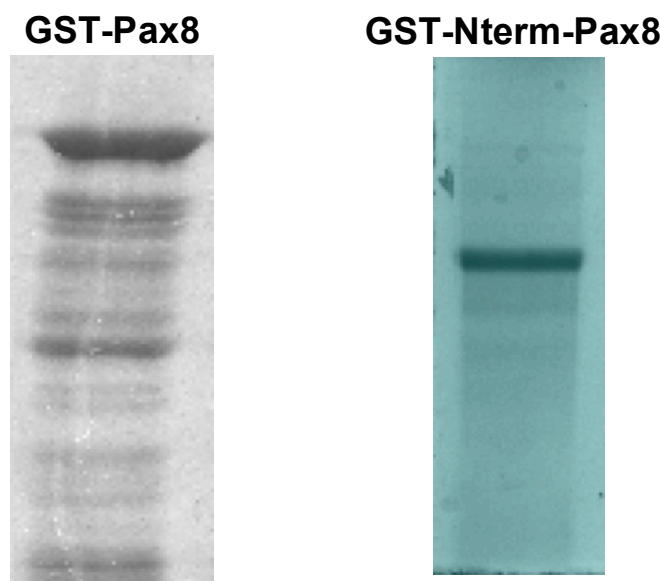
Uno degli scopi prefissati durante il lavoro di tesi è stato quello di mettere a punto possibili modifiche al fine di migliorare l'efficienza del GST *pull-down* che dopo tutto si è rivelato il sistema più efficace nel nostro caso. Il limite principale di tale approccio è stato rappresentato dall'eccessiva degradazione della proteina di fusione GST-Pax8 *full-length*. Dopo uno studio approfondito, abbiamo deciso di fondere il dominio GST sia alla porzione amminoterminale (Nterm) che a quella carbossiterminale (Cterm) di Pax8. Nella figura 30 è mostrata la strategia di

produzione e purificazione proteica che ci ha permesso di apportare due grandi miglioramenti al sistema GST *pull-down*.



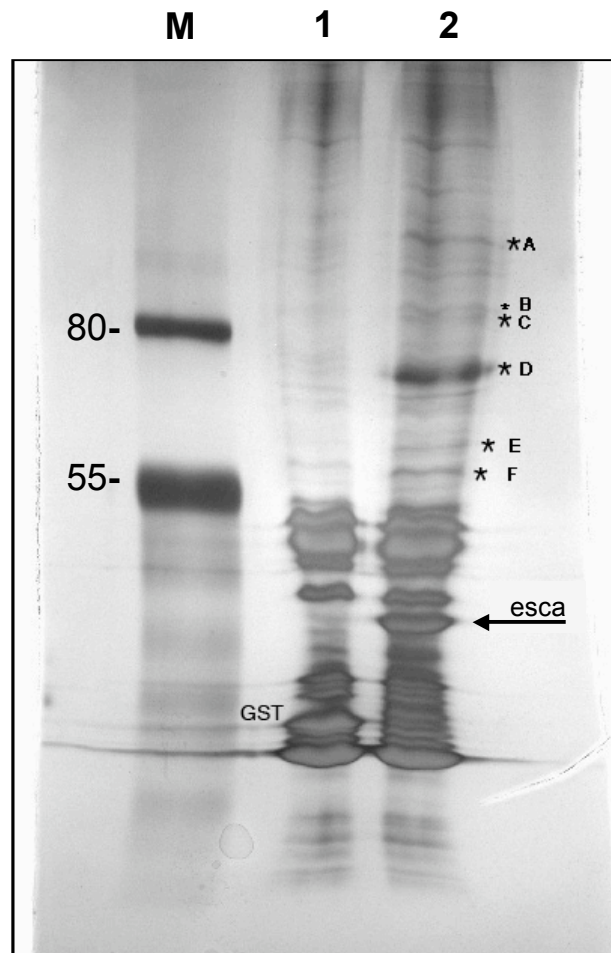
**Figura 30:** Strategia di produzione delle due proteine di fusione derivate da GST-Pax8 *full-length*. I due domini funzionali di Pax8 sono divisi nelle due nuove proteine di fusione in modo da distinguere le regioni di legame con gli eventuali interattori.

Anzitutto, date le dimensioni delle due metà di Pax8 (Nterm-Pax8 e Cterm-Pax8), la purificazione delle stesse è avvenuta in condizioni semplificate; normalmente, la dimensione della proteina prodotta è inversamente proporzionale alla sua solubilità all'interno dei batteri. In secondo luogo, la degradazione della proteina di fusione osservata per GST-Pax8 *full-length* è quasi completamente annullata durante la produzione, ad esempio, della proteina GST-Nterm-Pax8 (Figura 31).



**Figura 31:** Comparazione tra i prodotti di degradazione di GST-Pax8 *full-length* e GST-Nterm-Pax8. I due gel colorati al Coomassie mostrano quanto sia evidente che, durante la produzione, GST-Nterm-Pax8 si degradi molto meno di GST-Pax8.

Abbiamo quindi proceduto al saggio di GST *pull-down* come descritto precedentemente salvo che nell'utilizzo di GST-Nterm-Pax8 come esca. Il gel nella figura 32 è il risultato del *pull-down* appena descritto, la quantità di bande differenziali ha lasciato ben sperare nell'identificazione di più interattori di Pax8.



**Figura 32:** Colorazione al nitrato d'argento di un gel al 12% in cui sono stati risolti gli eluati di un esperimento di GST *pull-down* effettuato con la proteina GST-Nterm-Pax8 (canale 2) e il controllo GST (canale 1). La freccia corrisponde all'esca GST-Nterm-Pax8. È stato preparato un gel al 12% per risolvere meglio le bande corrispondenti a proteine di peso molecolare più alte dell'esca per evitare di sequenziare eventuali degradazioni dell'esca stessa.

Come mostrato nella tabella 3, l'analisi al MADLI-TOF del gel in figura 32 ha dato risultati controversi se non per la conferma, non meno importante, dell'interazione di Pax8 con la proteina Xrcc5. Tale analisi, sempre come mostrato in tabella 3, ha descritto interazioni aspecifiche di Pax8 con proteine citosoliche (es. alfa-tubulina e beta-glucoronidasi), nonché improbabili interazioni dello stesso fattore Pax8 con alcune delle proteine della famiglia delle *Heat-Shock Proteins*.



#	NOME	CODICE
A	NON IDENTIFICATA	
B	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hanster cells 5 (Xrcc5)	Q6P7P8
C	Heat shock protein 90-beta (HSP90ab1)	P34058
D	Beta-glucuronidase (Gusb)	P06760
E	60 kDa heat shock protein (Hspd1) Beta-glucuronidase (Gusb)	P63039 P63039
F	Tubulin alpha-1 chain (Tuba1)	P68370

**Tabella 3:** Proteine identificate mediante l'analisi MALDI-TOF dopo un esperimento di GST *pull-down*..

## DISCUSSIONE

L'organizzazione del genoma eucariotico è molto complessa e le sequenze non codificanti partecipano al mantenimento di questa complessità. La maggior parte del genoma di una cellula differenziata è silente, cioè non è espressa (van Driel et al., 2003). Allo stesso tempo, alcuni geni sono espressi esclusivamente in un tipo cellulare, mentre altri sono espressi sempre e dovunque, ossia sono ubiquitari. I fattori di trascrizione legano specifiche sequenze sul DNA non codificante (regioni regolative) e permettono la trascrizione di regioni altrimenti silenti. La prerogativa fondamentale per cui una regione genica risulta trascritta, e quindi attiva in uno o più tipi cellulari, è la presenza di proteine che leghino il promotore della regione genica stessa. Si può quindi affermare che, nella maggioranza dei casi, tali fattori determinino effettivamente il differenziamento cellulare (Hsia and McGinnis, 2003; Holstege and Clevers, 2006). D'altra parte è vero che, se i fattori trascrizionali sono i principali giocatori durante la determinazione del fenotipo cellulare, è altresì vero che le proteine accessorie, la cui combinazione è unica nei diversi tipi cellulari, hanno un ruolo altrettanto fondamentale nella scelta fenotipica della cellula. In tal senso possiamo dedurre che, se si conoscono i fattori trascrizionali responsabili di un fenotipo differenziato cellulare, è certamente utile andare a studiare i co-fattori presenti nell'architettura dei complessi trascrizionali alla base del processo di differenziamento (Bjorklund and Gustafsson, 2005).

È su queste osservazioni che si basa questo lavoro di tesi. Il modello cellulare da noi scelto è stata la cellula tiroidea differenziata. Brevemente, la cellula tiroidea differenziata esprime i tre fattori trascrizionali tessuto-specifici TTF-1, Pax8 e FoxE1, nonché i geni marcatori del differenziamento, ossia la tireoglobulina, la tireoperossidasi, la pompa dello iodio ed il recettore del TSH. La tireoglobulina è un precursore degli ormoni tiroidei che è processato da attività enzimatiche, tra cui quella della tireoperossidasi, nel processo di formazione degli ormoni tiroidei. Questi due geni non hanno alcuna relazione fra loro, ma sono funzionalmente legati perché espressi nello stesso tipo differenziato, ovvero il tireocita. La condivisione di siti di legame per fattori di trascrizione sul promotore di questi geni contribuisce al loro legame funzionale. I fattori trascrizionali che agiscono su tali promotori sono però solo parte della infrastruttura di connessione tra proteine che rendono la cromatina accessibile al macchinario trascrizionale e la RNA polimerasi. Come appena descritto, è ormai chiaro che solo una piccola percentuale delle proteine agisce come

unità monomerica, le altre, la maggioranza di tutte le proteine cellulari, lavorano in associazione con partner proteici o fanno parte di complessi molecolari.

Pax8 è un fattore trascrizionale determinante per il differenziamento delle cellule tiroidee. Il suo ruolo è oggetto di approfondito studio da molto tempo. Il meccanismo di regolazione del differenziamento tiroideo è stato in parte chiarito dagli esperimenti effettuati in cellule trasformate da oncogeni. Questi esperimenti hanno evidenziato il ruolo centrale occupato dal fattore di trascrizione Pax8 nel mantenimento del fenotipo differenziato delle cellule tiroidee. È stato infatti dimostrato che nelle cellule tiroidee trasformate dall'oncogene middleT di Polyoma, il differenziamento viene perso a causa della forte riduzione dell'espressione di Pax8. Infatti, la riespressione di un Pax8 esogeno all'interno di queste cellule è seguita dalla riespressione dei marcatori del differenziamento tiroideo quali la tireoglobulina, la tireoperossidasi ed il trasportatore dello iodio (Pasca di Magliano et al., 2000). Abbiamo quindi scelto di ricercare più approfonditamente gli eventuali interattori biochimici e funzionali del fattore di trascrizione Pax8.

Alcuni anni fa, nel nostro laboratorio, è stato dimostrato che i fattori trascrizionali TTF-1 e Pax8 agiscono in maniera sinergica sul promotore del gene della tireoglobulina (Di Palma et al., 2003). Quest'osservazione ci ha permesso di controllare la veridicità degli esperimenti descritti nei risultati seguendo l'interazione descritta tra i fattori di trascrizione Pax8 e TTF-1. Sulla base del mantenimento di quest'interazione, infatti, abbiamo messo a punto diverse metodologie di isolamento di proteine che interagiscono col fattore trascrizionale Pax8.

Il nostro primo intento era di isolare il più completo complesso multiproteico specifico di Pax8 e, per fare ciò, in primo luogo abbiamo selezionato le metodiche biochimiche da utilizzare. Abbiamo pensato che approcciare la stessa problematica, con differenti tecniche, sarebbe stata la soluzione migliore per ottenere un panorama più completo dei possibili interattori di Pax8. In più, una tecnica avrebbe potuto fungere da controllo per un'altra e viceversa, avremmo così avuto una più accurata convalida dei risultati ottenuti. Come risulta evidente nella sezione "risultati", siamo stati in grado di produrre solo parte dei dati desiderati. Ovvero, siamo riusciti ad ottenere pochi interattori interessanti e quindi un quadro incompleto del complesso multiproteico di Pax8. Questo, d'altra parte, ha fatto sì che riuscissimo a farci un quadro molto chiaro delle problematiche che stanno alle spalle di obiettivi tanto concreti come quello di isolare complessi multiproteici di fattori trascrizionali.

Entrando più nello specifico del procedimento logico seguito, abbiamo scelto le migliori tecniche di purificazione attualmente in uso e siamo stati capaci di metterle a

punto mantenendo come controllo l'interazione nota tra Pax8 e TTF-1. Abbiamo quindi valutato in parallelo i quattro i sistemi: 3XFLAG®, TAP, FLAP e GST. I sistemi più affidabili, cioè i primi tre, hanno sorprendentemente dato scarsi risultati e ci hanno persuaso a pensare che forse isolare un complesso proteico di un fattore trascrizionale sarebbe stato più complicato di quanto previsto. Non a caso in letteratura mancano le conferme dell'avvenuto isolamento di complessi proteici appartenenti a fattori trascrizionali. Indipendentemente da questo, la nostra messa a punto dei sistemi di purificazione ha sempre lasciato ben sperare in una riuscita più o meno difficoltosa. Il sistema 3XFLAG® in un primo momento ha dato pessimi risultati ma, dopo la nota informativa della Sigma e l'inserimento di un passaggio di purificazione ulteriore, ha mostrato le sue qualità. La problematica principale, che resterà la stessa durante tutto il percorso descritto in questa tesi, è che negli estratti proteici totali le proteine citoplasmatiche risultano essere stechiometricamente in eccesso rispetto alle proteine nucleari per le quali tutti i siti di legame su Pax8 verrebbero fisicamente mascherati da proteine aspecifiche. Il risultato finale, in questo modo, viene completamente invalidato da falsi interattori. Un'altra nostra ipotesi è che durante il legame a Pax8, le proteine nucleari, inferiori per numero a quelle citoplasmatiche, riescano comunque a legare Pax8 ma, una volta corso il gel analitico, le bande aspecifiche sarebbero tali e tante da coprire le bande specifiche all'analisi di spettrometria al MALDI-TOF. Questo verrebbe a significare che una probabile soluzione al problema potrebbe essere quella di correre esclusivamente gel bidimensionali e separare le proteine, oltre che per peso, anche per punto isoelettrico. Per quanto riguarda il TAP, purtroppo, abbiamo dovuto constatare che la perdita di materiale di partenza, ossia di estratto proteico, era troppo elevata per procedere ad una ulteriore messa a punto del sistema. A parte il problema su descritto degli estratti proteici totali, il TAP associava una scarsa qualità di taglio enzimatico da parte della TEV nonché una bassa specificità del CbD alla resina-Calmodulina. Abbiamo pensato di risolvere una parte di questi problemi inventandoci il nuovo epitopo FLAP. Finora in letteratura sono già stati riportati alcuni tentativi di modifiche strutturali apportate al sistema TAP (Yang P. et al., 2006; Drakas R. et al., 2005). Il nostro epitopo, tutt'ora nuovo alla letteratura, ha fatto sì che il sistema di purificazione migliorasse sensibilmente ma, nel nostro modello, non siamo riusciti ad ottenere dati soddisfacenti per cui, in attesa di nuovi tentativi sperimentali, siamo costretti a tenerlo all'oscuro dalla comunità scientifica. Quest'ultimo tentativo ha siglato la fine delle nostre possibilità di purificare il complesso multiporteico di Pax8 in condizioni native. Valutando la possibilità di poter comunque ottenere dati, e

quindi interattori di Pax8, interessanti per il nostro studio, abbiamo considerato di utilizzare il sistema meno fisiologico del GST *pull-down*. I problemi già descritti del GST *pull-down* ci hanno chiaramente fatto abbandonare l'idea di purificare un complesso multiproteico contenente Pax8 a favore dell'identificazione di interattori "pescati" singolarmente. Nonostante le problematiche già affrontate riguardo la qualità dell'estratto proteico utilizzato, questa metodica ci ha dato risultati molto più interessanti delle tre tecniche appena descritte. Questo è possibile perchè, proprio in quanto meno fisiologico, questo sistema permette di utilizzare un eccesso di esca (GST-Pax8) tale da permettere di individuare gli interattori specifici attraverso la molteplicità di interattori aspecifici descritti. I risultati ottenuti, dimostrano la veridicità della teoria esposta, in quanto l'interazione tra la proteina PARP-1 e la nostra esca Pax8 è stata dimostrata e convalidata con la suddetta tecnica del GST *pull-down*. Tuttavia, anche in questo caso, l'utilizzo di gel bidimensionali avrebbe certamente rivelato la presenza di altri interattori reali di Pax8, ma lo studio degli interattori attualmente identificati a fatto sì che le ricerche di nuovi interattori venissero temporaneamente tralasciate. Il successo del GST *pull-down* ci ha spinti a pensare alle modifiche necessarie da apportare alla tecnica per ovviare ai problemi di specificità e pulizia dei risultati. Siamo così giunti all'ingegnerizzazione dei due costrutti disegnati spezzando la proteina Pax8 in due metà fuse al dominio GST: il GST-Nterm-Pax8 ed il GST-Cterm-Pax8. Questa modifica, per ora sperimentata con la proteina GST-Nterm-Pax8, ha reso l'esperimento più affidabile ed ha confermato parzialmente i dati ottenuti con il primo *pull-down*, ovvero l'interazione tra Pax8 e Xrcc5. Non ci aspettavamo di confermare entrambe le interazioni di PARP-1 e Xrcc5, anzi, il fatto di aver confermato, per adesso, la prima interazione ci conforta e ci stimola a proseguire con il secondo *pull-down* in corso attualmente nel laboratorio con la proteina di fusione GST-Cterm-Pax8. C'è da aggiungere che è verosimile pensare che serva l'altra metà della proteina Pax8 per poter confermare l'iterazione tra Pax8 e PARP-1. Nel peggiore dei casi tale interazione potrebbe non essere mai confermata con l'utilizzo di GST-Nterm-Pax8, ma solamente con la regione centrale spezzata di Pax8 per cui non è stato pensato nessun costrutto.

In ogni caso, la ricerca di interattori di Pax8 non si è fermata a queste tecniche descritte ma ci siamo mossi anche in un'altra direzione, ugualmente fisiologica ma meno innovativa. Abbiamo deciso da qualche tempo di effettuare una ricerca mirata di possibili interattori e di confermare successivamente tale interazione per co-immunoprecipitazione. Seguendo questa idea, il laboratorio si è mosso alla ricerca di molecole espresse in tiroide che apparissero in letteratura come generici interattori o

modulatori di fattori trascrizionali. Abbiamo analizzato una proteina molto interessante chiamata TAZ (Kanai F. et al., 2000) descritta come co-attivatore trascrizionale, isolata da una libreria di cDNA ed espressa in maniera quasi ubiquitaria. Abbiamo confermato prima la sua espressione in tiroide, poi la sua interazione con Pax8 mediante saggi di co-immunoprecipitazione. Gli esperimenti su TAZ sono in corso e, ad oggi, danno risultati confortanti. Anche la ricerca mirata di interattori è tutt'ora in corso grazie ad un continuo aggiornamento della bibliografia scientifica a riguardo.

Per quanto riguarda il quadro del proteoma di Pax8, la nostra idea, venuta delineandosi dopo diversi anni di esperienza, è che probabilmente tale proteoma è in uno stato transitorio, come spesso avviene per molecole implicate nella trascrizione. Ovvero, che il complesso multiproteico comprendente Pax8 non sia né uno solo, né stabile nel tempo. Esprimendosi in altri termini, molte proteine appartengono al complesso multiproteico di Pax8, alcune delle quali solo per pochi istanti ed in particolari condizioni. Pertanto, parlare del complesso multiproteico di Pax8 come entità singolare è verosimilmente un errore dato che, a tutti gli effetti, dovrebbero esistere molteplici complessi di Pax8 contenenti le più diverse proteine e con le più differenti funzioni all'interno del tireocita.

## MATERIALI E METODI

### **Plasmidi.**

I costrutti codificanti le due proteine di fusione GST-Pax8 e GST-Nterm-Pax8 sono stati ottenuti subclonando nel sito EcoRI del vettore pGEX-4T le regioni corrispondenti rispettivamente ai cDNA di Pax8 *full-length* e di Pax8 *Paired Domain* (N-terminale). L'orientamento delle sequenze è stato verificato mediante sequenziamento dei plasmidi.

Il costrutto 3XFLAG-Pax8 è stato generato amplificando mediante PCR la regione codificante Pax8. Per il clonaggio sono stati utilizzati oligonucleotidi aventi alle loro estremità i siti di restrizione EcoRI e XbaI, gli stessi siti scelti nel vettore 3XFLAGCMV-10 (Sigma-Aldrich).

Il costrutto TAP-Pax8 è stato generato amplificando mediante PCR la regione codificante Pax8 e la regione codificante l'epitopo TAP fornitoci dal laboratorio di Juerg Mueller dell'European Molecular Biology Laboratory (Heidelberg, Germania). Abbiamo utilizzato il vettore pCDNA3 (invitrogen) opportunamente modificato (pCEFL) subclonando prima Pax8 nei siti EcoRI e XbaI, poi il TAP, a monte della sequenza codificante Pax8, nei siti BamHI e EcoRI.

Il costrutto FLAP-Pax8 è stato generato amplificando mediante PCR l'intera sequenza di 3XFLAG<sup>®</sup>-Pax8 dal vettore sopra descritto e la sequenza codificante per il peptide PAP-sitoTEV dal vettore codificante l'epitopo TAP. Abbiamo subclonando nel vettore pCEFL la sequenza codificante per 3XFLAG<sup>®</sup>-Pax8 nei siti BamHI e XbaI; a monte di tale sequenza abbiamo clonato il peptide PAP-sitoTEV nel sito BamHI. L'orientamento del frammento è stato controllato mediante digestione differenziale del vettore.

I plasmidi usati nelle trasfezioni transienti sono stati descritti precedentemente e sono i seguenti: Tg-CAT (Sinclair et al., 1990); TPO-LUC (Francis-Lang et al., 1992); CMV-TTF-1 (Guazzi et al., 1990) e pCMV5-Pax8 (Zannini et al., 1992).

I plasmidi CMV-CAT e CMV-LUC sono usati come controlli interni negli esperimenti di trasfezione. Il DNA di tutti i plasmidi è stato preparato utilizzando il Kit di maxipreparazione di DNA Qiagen (Qiagen GmbH, Germania)

## **Culture cellulari e trasfezioni.**

Le linee cellulari PC Cl3 ed HeLa sono già state descritte precedentemente (Berlingieri et al., 1988).

Le cellule PC Cl3 sono state cresciute nel mezzo F12 Coon's modificato (Euroclone) in presenza di 5% siero (Euroclone), sei ormoni e fattori di crescita come descritto da Ambesi-Impiombato e Coon (Ambesi Impiombato and Coon 1979).

Per i saggi di trasfezione stabile le cellule sono state piastrate alla densità di  $6 \times 10^5$  cellule/100-mm, 24 ore prima della trasfezione. Dopo 48 ore dalla trasfezione sono state messe in selezione con 0.4mg/ml di G418 (Invitrogen) e sono state mantenute sotto selezione fino alla comparsa di cloni. I diversi cloni ottenuti, sono stati cresciuti e tra essi sono stati identificati quelli che esprimevano stabilmente le proteine 3XFLAG-Pax8, TAP-Pax8 e FLAP-Pax8.

Le cellule HeLa sono state cresciute in DMEM (Euroclone) con aggiunta di 10% siero fetale. Per gli esperimenti di trans-attivazione, le cellule sono state piastrate alla densità di  $3 \times 10^5$  cellule/60-mm, 5-8 ore prima della trasfezione. Tutte le trasfezioni sono state eseguite con il Fugene 6 (Roche Diagnostic) secondo il protocollo consigliato dalla ditta. In tutti gli esperimenti è stato usato un rapporto DNA/Fugene di 1/2.

## **Estratti cellulari.**

Le cellule HeLa, transientemente trasfettate, sono state lavate con PBS 1X, raccolte in 0.5ml del tampone TEN (40mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA, 150mM NaCl) e centrifugate a 6000 rpm per 5 minuti nella microcentrifuga. Il sedimento è stato sottoposto a due cicli di congelamento/scongelamento prima di essere risospeso in 100 $\mu$ l del tampone di lisi (10mM Hepes pH 7,9, 0,1mM EGTA, 0,5mM DTT, 5% glicerolo, 0,5mM PMSF, 400mM NaCl). Il lisato proteico è stato chiarificato mediante centrifugazione per 30 minuti a 14000 rpm nella microcentrifuga.

Le cellule PC Cl3, lavate e raccolte in PBS 1X, sono state centrifugate a 6000 rpm per 5 minuti nella microcentrifuga. Il pellet è stato risospeso in 250  $\mu$ l/150-mm di buffer JS [50mM Hepes pH 7,5, 150mM NaCl, 10% Triton X100, 1% glicerolo, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1mM EGTA, inibitori di proteasi e fosfatasi (SIGMA)]. Il lisato proteico è stato chiarificato mediante centrifugazione per 30 minuti a 14000 rpm nella



microcentrifuga. La determinazione della concentrazione proteica degli estratti è stata eseguita mediante il saggio Bradford (BIORAD).

### **Preparazione della proteina ricombinante.**

Le proteine ricombinanti GST-Pax8 e GST-Nterm-Pax8 sono state purificate dalle cellule batteriche BL21 (DE) LysS trasformate rispettivamente con i costrutti pGEX-Pax8 e pGEX-Nterm-Pax8. La procedura è stata la stessa per entrambe le purificazioni. Quando la coltura cellulare è cresciuta fino a raggiungere un'assorbanza pari a 600 OD, è stata indotta l'espressione della proteina aggiungendo IPTG a concentrazione finale di 0,1mM. Le cellule sono state raccolte quattro ore dopo, risospese nel buffer di lisi (PBS 1X, 0,5mM EDTA, 1mg/ml lisozima, 0,5mM DTT, 1mM PMSF, inibitori di proteasi) e sonicate. L'estratto cellulare, dopo l'aggiunta di 1% Triton X-100 è stato ultracentrifugato a 40000 rpm per 40 min a 4°C. A questo punto si è deciso di purificare la proteina di fusione dal supernatante mediante cromatografia d'affinità su una resina glutatione-agarosio (GE Healthcare-Amersham Biosciences). La resina precedentemente equilibrata nel washing buffer (10mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM EDTA, 5mM DTT, 100mM NaCl), è stata incubata con il sovrinatante in agitazione per 20 minuti a 4°C. Dopo l'incubazione è stata centrifugata a 2200 rpm per 5 minuti a 4°C nella microcentrifuga ed il sovrinatante è stato incubato nuovamente con altra resina glutatione-agarosio, per purificare altra eventuale proteina ricombinante, che non si fosse legata nella prima incubazione. Dopo il legame, la resina è stata lavata per 3 volte con Washing buffer (10mM Tris-HCl, pH 8,0, 100mM NaCl, 5mM EDTA, 5mM DTT), per allontanare le proteine aspecifiche eventualmente legate ad essa. A questo punto la proteina di fusione GST-Pax8 è stata eluita dalla resina glutatione-agarosio, incubando quest'ultima per 10 min. a 4°C con il buffer d'eluizione (10mM GSH (glutatione ridotto), 50mM Tris-HCl pH 8,0, 50mM NaCl) e poi centrifugando a 2200 rpm per 5 minuti a 4°C. Il processo d'eluizione è stato ripetuto tre volte, al fine di purificare la massima quantità della proteina GST-Pax8. La concentrazione proteica è stata determinata mediante colorazione Coomassie blue.

### **Saggio di GST-pull down.**

Per il saggio di GST-*pull down* 4 $\mu$ g delle proteine GST e GST-Pax8 sono state incubate con 50 $\mu$ l di resina glutatione-sefariosio in agitazione a 4°C per 20 minuti. Le proteine legate alla resina sono state centrifugate in microcentrifuga a 2200 rpm per 5 minuti e lavate due volte con il buffer WCE (50mM Tris-HCl, pH 7,5, 100mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 10% glicerolo, 1mM DTT, 1mM PMSF ed inibitori di proteasi), dopodiché sono state incubate per 90 minuti a 4°C in agitazione con 3mg di estratto totale preparato dalle cellule PC Cl3. Dopo l'incubazione il sovranatante è stato allontanato mediante centrifugazione e la resina, con le proteine legate, è stata sottoposta a molti lavaggi nel buffer WCE. Le proteine legate alla resina sono state eluite, risospendendo direttamente la resina nel sample buffer 2X SDS-PAGE e denaturando a 95°C per 5 minuti.

Per il saggio di GST-*pull down* in larga scala 200 $\mu$ g di GST, precedentemente legata a 100 $\mu$ l di resina glutatione-sefariosio, è stata incubata per 1h a 4°C in agitazione con 150mg di estratto totale preparato dalle PC Cl3. Il sovrinatante, è stato incubato per altre 3h a 4°C in agitazione con 100 $\mu$ g di GST e 100 $\mu$ g di GST-Pax8, precedentemente legate a 100 $\mu$ l di resina glutatione-sefariosio. Le proteine legate alla resina dopo molti lavaggi nel buffer EBC [50mM Tris-HCl, pH 7,5, 120mM NaCl, 0,5% Nonidet P-40, 10% glicerolo, inibitori di proteasi e fosfatasi (SIGMA)] sono state eluite, risospendendo direttamente la resina nel sample buffer 2X SDS-PAGE e denaturando a 95°C per 5 minuti.

### **Immunoprecipitazione.**

Gli esperimenti di co-immunoprecipitazione sono stati condotti, incubando 2mg di estratto totale preparato nel buffer EBC [50mM Tris-HCl, pH 7,5, 120mM NaCl, 0,5% Nonidet P-40, 10% glicerolo, inibitori di proteasi e fosfatasi (SIGMA)] con 20 $\mu$ l di resina anti-FLAG agarosio affinity gel (SIGMA), precedentemente equilibrata nello stesso buffer, a 4°C in agitazione per 16h-18h. I campioni sono stati centrifugati a 2200 rpm per 5 minuti a 4°C nella microcentrifuga e dopo cinque lavaggi con il buffer EBC le proteine sono state eluite nel sample buffer 2X SDS-PAGE e denaturate a 95°C per 5 minuti, prima di essere caricate sul gel.

### **Purificazione per affinità del complesso FLAG.**

150mg di estratto totale, preparato risospendendo le cellule nel buffer EBC [50mM Tris-HCl, pH 7,5, 120 mM NaCl, 0,5% Nonidet P-40, 10% glicerolo, inibitori di proteasi e fosfatasi (SIGMA)], è stato incubato con 200µl di resina IgG-agarosio (SIGMA), prima attivata nel buffer fosfato PB (0,01M sodio fosfato, pH 7,2), contenente 0,5M NaCl e poi equilibrata nel buffer EBC, per 3h a 4 °C in agitazione. Il sovranatante è stato poi incubato con 200µl di resina anti-FLAG® agarosio affinity gel (SIGMA), precedentemente equilibrata nel buffer EBC, a 4 °C in agitazione per 16h-18h. A questo punto il sovrinatante è stato allontanato, mentre la resina è stata estensivamente lavata con 5 volumi di buffer EBC. Le proteine sono state eluite con 5 volumi di buffer EBC, contenente 0,2mg/ml di peptide 3XFLAG® (SIGMA) per 1h a 4°C. In mancanza del *pre-clearing* l'estratto totale è stato incubato direttamente con la resina anti-FLAG e poi purificato, seguendo tutti i passaggi sopra descritti.

### **Purificazione del complesso mediante TAP.**

Il protocollo TAP è stato elaborato secondo letteratura (Rigaut et al., 1999; Forier et al., 2002). 150mg di estratto totale, preparato risospendendo le cellule nel buffer EBC [50mM Tris-HCl, pH 7,5, 120 mM NaCl, 0,5% Nonidet P-40, 10% glicerolo, inibitori di proteasi e fosfatasi (SIGMA)], è stato incubato con 200µl di resina IgG-agarosio (GE Healthcare-Amersham Biosciences) in rotazione per 2h a 4°C. La resina centrifugata, dopo l'aggiunta di 5µl di proteasi TEV (Invitrogen), è stata incubata in buffer EBC in rotazione per 1h a 20°C. Il sovrinatante è stato incubato con 400µl di resina-Calmodulina precedentemente equilibrata in buffer EBC con aggiunta di calcio (20mM CaCl<sub>2</sub>). Dopo incubazione per 3h a 4°C, la resina è stata lavata in buffer EBC con aggiunta di calcio (40mM CaCl<sub>2</sub>) e risospesa in buffer EBC con chelanti (10mM EGTA). Le eluizioni sono state risospese in buffer di corsa Laemmli e bollito a 95°C prima della corsa su gel.

### **Purificazione del complesso mediante FLAP.**

150mg di estratto totale, preparato risospendendo le cellule nel buffer EBC [50mM Tris-HCl, pH 7,5, 120 mM NaCl, 0,5% Nonidet P-40, 10% glicerolo, inibitori di

proteasi e fosfatasi (SIGMA)], è stato incubato con 200 $\mu$ l di resina IgG-agarosio (GE Healthcare-Amersham Biosciences) in rotazione per 2h a 4°C. La resina centrifugata, dopo l'aggiunta di 5 $\mu$ l di proteasi TEV (Invitrogen), è stata incubata in buffer EBC in rotazione per 1h a 20°C. Il sovranatante è stato poi incubato con 200 $\mu$ l di resina anti-FLAG<sup>®</sup> agarosio affinity gel (SIGMA), precedentemente equilibrata nel buffer EBC, a 4 °C in agitazione per 16h-18h. A questo punto il sovranatante è stato allontanato, mentre la resina è stata estensivamente lavata con 5 volumi di buffer EBC. Le proteine sono state eluite con 5 volumi di buffer EBC, contenente 0,2mg/ml di peptide 3XFLAG<sup>®</sup> (SIGMA) per 1h a 4°C.

### **Analisi cromatografica di Pax8 e TTF-1.**

L'estratto totale preparato nel buffer EBC [50mM Tris-HCl, pH 7,5, 120mM NaCl, 0,5% Nonidet P-40, 10% glicerolo, inibitori di proteasi e fosfatasi (SIGMA)] è stato caricato sulla colonna Sepharose 6HR (GE Healthcare-Amersham Biosciences), equilibrata nel buffer A (100mM sodio fosfato, pH 7,2, 120mM NaCl). La colonna è stata corsa nel buffer A a 0,5ml/min e gli eluati sono stati raccolti in frazioni di 0,5ml. Alcune frazioni sono state precipitate con 25% acido tricloroacetico, prima di essere caricate su SDS-PAGE.

### **Anticorpi, Immunoblot e colorazione al nitrato d'argento.**

Gli anticorpi contro le proteine TTF-1 e Pax8 sono stati purificati nel laboratorio del prof. Di Lauro e sono stati diluiti 1/1000 ed 1/5000 rispettivamente in una soluzione di 0,5% BSA in TTBS 1X (200mM Tris-HCl, pH 7,5, 9% NaCl), contenente 0,05% Tween 20. L'anticorpo anti-FLAG-M2<sup>®</sup> (SIGMA) è stato diluito 1/5000 in una soluzione di latte al 5% in TTBS 1X, contenente 0,05% Triton X-100.

Dopo la separazione mediante corsa elettroforetica su SDS-PAGE, le proteine sono state trasferite su membrane di Immobilon-P (Millipore, Germany). I *blots* sono stati sottoposti a successivi trattamenti prima con gli appropriati anticorpi primari e poi con gli anticorpi secondari coniugati alla perossidasi, i quali hanno permesso d'immunorivelare le proteine mediante chemiluminescenza (ECL Kit; GE Healthcare-Amersham, Biosciences).

La colorazione dei gels al nitrato d'argento è stata eseguita secondo il protocollo Shevchenko (Shevchenko et al., 1996). I gels sono stati inviati all'ISPAAM-CNR di Napoli nel laboratorio del dott. A. Scaloni, dove sono stati estensivamente decolorati e sottoposti a digestione enzimatica e a sequenziamento mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.

### **Oligonucleotidi.**

Gli oligonucleotidi sintetici impiegati in questo lavoro di tesi sono stati acquistati dalla PRIMM s.r.l.

Le sequenze sono state eseguite dal Servizio di Biologia Molecolare della Stazione Zoologica "Anton Dohrn" di Napoli.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Ambesi-Impiombato, F.S. and Coon, H.G. (1979) Thyroid cells in culture *Int. Rev. Cytol.* **10**:163-172.
- Bachiller D., Macias A., Duboule D. and Morata G. (1994) Conservation of a functional hierarchy between mammalian and insect Hox/HOM genes. *EMBO J.* **15**;13(8):1930-41.
- Berlingieri, M., Portella, G., Grieco, M., Santoro, M. and Fusco, A. (1988) Cooperation between the polyomavirus middle-T-antigen gene and the human c-myc oncogene in a rat thyroid epithelial differentiated cell line: model of in vitro progression *Mol. Cell. Biol.* **8**:2261-2266.
- Bjorklund S. and Gustafsson C.M. (2005) The yeast Mediator complex and its regulation. *Trends Biochem. Sci.* **30**(5):240-4. Review.
- Bohinski, R.J., Di Lauro, R. and Whitsett, J.A. (1994) The lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ-specific gene expression along the foregut axis *Mol. Cell. Biol.* **14**:5671-5681.
- Bruno, M.D., Bohinski, R.J., Huelsman, K.M., Whitsett, J.A. and Korfhangen, T. R. (1995) Lung cell-specific expression of the murine surfactant protein A (SP-A) gene is mediated by interactions between the SP-A promoter and thyroid transcription factor-1 *J. Biol. Chem.* **270**:6531-6536.
- Chun, J.T., Di Dato, V., Zannini, M. and Di Lauro, R. (2004) The CRE-Like Element Inside the 5'-Upstream region of the Rat Sodium/Iodide Symporter Gene interacts with Diverse Classes of b-Zip Molecules that Regulate Transcriptional Activities through Strong Synergy with Pax-8 *Mol. Endocrin.* **18**:2817-2829.
- Civitareale, D., Lonigro, R., Sinclair, A.J. and Di Lauro, R. (1989) A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter *EMBO J.* **8**:2537-2542.
- Congdon, T., Nguyen, L.Q., Nogueira, C.R., Habiby, R.L., Medeiros-Neto, G. and Kopp, P. (2001) A novel mutation (Q40P) in Pax8 associated with congenital hypothyroidism and thyroid hypoplasia: evidence for phenotypic variability in mother and child *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**:3962-3967.

- Damante, G. and Di Lauro, R. (1994) Thyroid-specific gene expression *Biochim. Biophys. Acta* **1218**:255-266.
- Damante, G., Tell, G. and Di Lauro, R. (2001) A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **66**:307-356.
- De Felice, M. and Di Lauro, R. (2004) Thyroid Development and Its Disorders: Genetics and Molecular Mechanisms *Endocr. Rev.* **25**:722-746.
- De Felice, M., Damante, G., Zannini, M., Francis-Lang, H. and Di Lauro, R. (1995) Redundant domains contribute to the transcriptional activity of the thyroid transcription factor 1 *J. Biol. Chem.* **270**:26649-26656.
- De Felice, M., Ovitt, C., Biffali, E., Rodriguez-Mallon, A., Arra, C., Anastassiadis, K., Macchia, P.E., Mattei, M.G., Mariano, A., Schoeler, H., Macchia, V. and Di Lauro, R. (1998) A mouse model for Hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate *Nat. Genet.* **19**: 395-398.
- de Murcia, G. and Menissier de Murcia, J. (1994) Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor *Trends Biochem. Sci.* **19**:172-176.
- Di Palma T., Nitsch R., Mascia A., Nitsch L., Di Lauro R. and Zannini M. (2003) The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. *J. Biol. Chem.* **31**;278(5):3395-402.
- Dorfler, P. and Busslinger, M. (1996) C-terminal activating and inhibitory domains determine the transactivation potential of BSAP (Pax-5), Pax-2 and Pax-8 *EMBO J.* **15**:1971-1982.
- Drakas R., Prisco M. and Baserga R. (2005) A modified tandem affinity purification tag technique for the purification of protein complexes in mammalian cells *Proteomics* **5**(1):132-7.
- Forler D., Kocher T., Rode M., Gentzel M., Izaurralde E. and Wilm M. (2003) An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. *Nat. Biotechnol.* **21**(1):89-92.
- Francis-Lang, H., Price, M., Polycarpou-Schwarz, M. and Di lauro, R. (1992) Cell-type-specific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression *Mol. Cell. Biol.* **12**:576-588.
- Fry C.J. and Farnham P.J. (1999) Context-dependent transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* **15**;274(42):29583-6. Review.

- Gruss, P. and Walther, C. (1992) Pax in development. *Cell* **69**:719-722.
- Guazzi, S., Price, M., De Felice, M., Damante, G., Mattei, M. G. and Di Lauro, R. (1990) Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity *Embo J.* **9**:3631-3639.
- Hermanson, O., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (2002) Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol Metab.* **13**:55-60.
- Holstege F.C. and Clevers H. (2006) Transcription factor target practice *Cell.* **13**;124(1):21-3. Review.
- Hsia C.C. and McGinnis W. (2003) Evolution of transcription factor function *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**(2):199-206.
- Kanai F., Marignani P.A., Sarbassova D., Yagi R., Hall R.A., Donowitz M., Hisaminato A., Fujiwara T., Ito Y., Cantley L.C. and Yaffe M.B. (2000) TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *EMBO J.* **15**;19(24):6778-91.
- Kelly, S.E., Bachurski, C.J., Burhans, M.S. and Glasser, S.W. (1996) Transcription of the lung-specific surfactant protein C gene is mediated by thyroid transcription factor 1 *J. Biol. Chem.* **271**:6881-6888.
- Kimura, S., Hara, Y., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P., Fox, C.H., Ward, J.M. and Gonzalez, F.J. (1996) The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary *Genes Dev.* **10**:60-69.
- Kimura, S., Ward J.M. and Minoo, P. (1999) Thyroid-specific enhancer-binding protein/thyroid transcription factor 1 is not required for the initial specification of the thyroid and lung primordia *Biochimie* **81**:321-327.
- Komatsu, M., Takahashi, T., Takahashi, I., Nakamura, M., Takahashi. I. and Takada. G. (2001) Thyroid dysgenesis caused by PAX8 mutation: the hypermutability with CpG dinucleotides at codon 31 *J. Pediatr.* **139**:597-599.
- Kornberg, R.D. (1999) Eukaryotic transcriptional control. *Trends. Cell. Biol.* **9**:46-49.
- Lazzaro, D., Price, M., De Felice, M. and Di Lauro, R. (1991) The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development* **113**:1093-1104.
- Loo J.A. (1997) Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass. Spectrom. Rev.* **16**(1):1-23. Review.



- Macchia, P.E., De Felice, M. and Di Lauro, R. (1999) Molecular genetics of congenital hypothyroidism *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**:289-294.
- Macchia, P.E., Lapi, P., Krude, H., Pirro, M.T., Missero, C., Chiovato, L., Souabni, A., Baserga, M., Tassi, V., Pinchera, A., Fenzi, G., Gruters, A., Busslinger, M., Di Lauro, R. (1998) PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis *Nat. Genet.* **19**:83-86.
- Malik, S. and Roeder, R.G. (2000) Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells *Trends Biochem. Sci.* **25**:277-283.
- Mansouri, A., Chowdhury, K. and Gruss, P. (1998) Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function *Nat. Genet.* **19**:87-90.
- Mauchamp, J., Mirrione, A., Alquier, C. and Andre, F. (1998) Follicle-like structure and polarized monolayer: role of the extracellular matrix on thyroid cell organization in primary culture *Biol. Cell.* **90**:369-380.
- Merika, M. and Thanos, D. (2001) Enhanceosomes *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**(2):205-8. Review.
- Nitsch, R., Di Palma, T., Mascia, A. and Zannini, M. (2004) WBP-2, a WW domain binding protein, interacts with the thyroid-specific transcription factor Pax8 *Biochem. J.* **377**:553-560.
- Ohmori, M., Endo, T., Harii, N. and Onaya, T. (1998) A novel thyroid transcription factor is essential for thyrotropin- induced up-regulation of Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene expression *Mol. Endocrinol.* **12**:727-736.
- Ohno, M., Zannini, M., Levy, O., Carrasco, N. and di Lauro, R. (1999) The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription *Mol. Cell. Biol.* **19**:2051-2060.
- Pabo, C.O. and Sauer, R.T. (1992) Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition *Annu. Rev. Biochem.* **61**:1053-1095.
- Pasca di Magliano, M., Di Lauro, R. and Zannini, M. (2000) Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**:13144-13149.
- Pellizzari, L., D'Elia, A., Rustighi, A., Manfioletti, G., Tell, G. and Damante, G. (2000) Expression and function of the homeodomain-containing protein Hex in thyroid cells *Nucleic Acids Res.* **28**:2503-2511.
- Perrone, L., Pasca di Magliano, M., Zannini, M. and Di Lauro, R. (2000) The thyroid transcription factor 2 (TTF-2) is a promoter-specific DNA-binding

independent transcriptional repressor *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**:203-208.

- Plachov, D., Chowdhury, K., Walther, C., Simon, D., Guenet, J.L. and Gruss, P. (1990) Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland *Development* **110**:643-651.
- Poleev, A., Okladnova, O., Musti, A.M., Schneider, S., Royer-Pokora, B. and Plachov, D. (1997) Determination of functional domains of the human transcription factor PAX8 responsible for its nuclear localization and transactivating potential. *Eur. J. Biochem.* **247**:860-869.
- Poleev, A., Wendler, F., Fickenscher, H., Zannini, M.S., Yaginuma, K., Abbott, C. and Plachov, D. (1995) Distinct functional properties of three human paired-box-protein, PAX8, isoforms generated by alternative splicing in thyroid, kidney and Wilms' tumors *Eur. J. Biochem.* **228**:899-911.
- Price, M., Lazzaro, D., Pohl, T., Mattei, M.G., Ruther, U., Olivo, J.C., Duboule, D. and Di Lauro, R. (1992) Regional expression of the homeobox gene Nkx-2.2 in the developing mammalian forebrain *Neuron* **8**:241-255.
- Ptashne, M., Gann, A. (1997) Transcriptional activation by recruitment *Nature* **386**:569-577.
- Rigaut G., Shevchenko A., Rutz B., Wilm M., Mann M. and Seraphin B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* **17**(10):1030-2.
- Rostom A.A. and Robinson C.V. (1999) Disassembly of intact multiprotein complexes in the gas phase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**(1):135-41. Review.
- Rostom, A.A., Fucini, P., Benjamin, D.R., Juenemann, R., Nierhaus, K.H., Hartl, F.U., Dobson, C.M. and Robinson, C.V. (2000) Detection and selective dissociation of intact ribosomes in a mass spectrometer *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**:5185-5190.
- Santisteban, P., Acebron, A., Polycarpou-Schwarz, M., Di Lauro, R. (1992) Insulin and insulin-like growth factor I regulate a thyroid-specific nuclear protein that binds to the thyroglobulin promoter *Mol. Endocrinol.* **6**:1310-1317.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels *Anal. Chem.* **68**:850-858.

- Sinclair, A.J., Lonigro, R., Civitareale, D., Ghibelli, L. and Di Lauro, R. (1990) The tissue-specific expression of the thyroglobulin gene requires interaction between thyroid-specific and ubiquitous factors *Eur. J. Biochem.* **193**, 311-8.
- Spiegelman, B.M. and Heinrich, R. (2004) Biological control through regulated transcriptional coactivators *Cell*. **119**:157-67.
- Thanos, D. and Maniatis T. (1995) Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell*. **29**;83(7):1091-100.
- Tong W.M., Cortes U., Hande M.P., Ohgaki H., Cavalli L.R., Lansdorp P.M., Haddad B.R. and Wang Z.Q. (2002) Synergistic role of Ku80 and poly(ADP-ribose) polymerase in suppressing chromosomal aberrations and liver cancer formation. *Cancer Res.* **1**;62(23):6990-6.
- van Berkel W.J., van den Heuvel R.H., Versluis C. and Heck A.J. (2000) Detection of intact megaDalton protein assemblies of vanillyl-alcohol oxidase by mass spectrometry. *Protein Sci.* **9**(3):435-9.
- van Driel R., Fransz P.F. and Verschure P.J. (2003) The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels *J. Cell. Sci.* **15**;116(Pt 20):4067-75. Review.
- Vilain, C., Rydlewski, C., Duprez, L., Heinrichs, C., Abramowicz, M., Malvaux, P., Renneboog, B., Parma, J., Costagliola, S. and Vassart, G. (2001) Autosomal dominant transmission of congenital thyroid hypoplasia due to loss-of-function mutation of PAX8 *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**:234-238.
- Walther, C., Guenet, J. L., Simon, D., Deutsch, U., Jostes, B., Goulding, M. D., Plachov, D., Balling, R. and Gruss, P. (1991) Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes *Genomics* **11**:424-434.
- Wolberger, C. (1998) Combinatorial transcription factors *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**:552-559.
- Yan, C., Sever, Z. and Whitsett, J. A. (1995) Upstream enhancer activity in the human surfactant protein B gene is mediated by thyroid transcription factor 1 *J. Biol. Chem.* **270**:24852-24857.
- Yang P., Sampson H.M. and Krause H.M. (2006) A modified tandem affinity purification strategy identifies cofactors of the Drosophila nuclear receptor dHNF4 *Proteomics* **6**(3):927-35.
- Zannini, M., Avantaggiato, V., Biffali, E., Arnne, M., Sato, K., Pischetola, M., Taylor, B., Phillips, S., Simeone, A. and Di Lauro, R. (1997) TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which

is consistent with a role in controlling the onset of differentiation *Embo J.* **16**:3185-3197.

- Zannini, M., Francis-Lang, H., Plachov, D. and Di Lauro, R. (1992) Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters *Mol. Cell. Biol.* **12**:4230-4241.
- Zhang, L., Whitsett, J.A., Stripp, B.R. (1997) Regulation of Clara cell secretory protein gene transcription by thyroid transcription factor-1 *Biochim. Biophys. Acta* **1350**:359-367.
- Zhang, Z., Torii, N., Furusaka, A., Malayaman, N., Hu, Z. and Liang, T.J. (2000) Structural and functional characterization of interaction between hepatitis B virus X protein and the proteasome complex *J. Biol. Chem.* **275**: 15157-15165.

## **PUBBLICAZIONI**

**D'Andrea B, Iacone R, Di Palma T, Nitsch R, Baratta MG, Nitsch L, Di Lauro R, Zannini M.** Functional inactivation of the transcription factor Pax8 through oligomerization chain reaction. *Mol Endocrinol.* 2006 Aug; **20**(8):1810-24. Epub 2006 Apr 13.

**Dentice M, Luongo C, Elefante A, Ambrosio R, Salzano S, Zannini M, Nitsch R, Di Lauro R, Rossi G, Fenzi G, Salvatore D.** Pendrin is a novel in vivo downstream target gene of the TTF-1/Nkx-2.1 homeodomain transcription factor in differentiated thyroid cells. *Mol Cell Biol.* 2005 Nov; **25**(22):10171-82.

**Nitsch R, Di Palma T, Mascia A, Zannini M.** WBP-2, a WW domain binding protein, interacts with the thyroid-specific transcription factor Pax8. *Biochem J.* 2004 Feb 1; **377**(Pt 3):553-60.

**Di Palma T, Nitsch R, Mascia A, Nitsch L, Di Lauro R, Zannini M.** The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. *J Biol Chem.* 2003 Jan 31; **278**(5):3395-402. Epub 2002 Nov 18.